

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia
Departamento de Química Farmacêutica e Terapêutica



Desenho, Síntese e Avaliação Biológica de Inibidores de Proteases de Cisteína

Lina Alexandra Lopes Fernandes

Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica

Lisboa

2011

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia
Departamento de Química Farmacêutica e Terapêutica



Desenho, Síntese e Avaliação Biológica de Inibidores de Proteases de Cisteína

Lina Alexandra Lopes Fernandes

Dissertação orientada pela Doutora Maria M. M. Santos e pelo Doutor Pedro M.
P. Góis, com vista à obtenção do grau de Mestre

Lisboa

2011

*"Se eu não morresse nunca e eternamente
buscasse e conseguisse a perfeição das coisas!"*

Cesário Verde

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos meus orientadores, Doutora Maria M. M. Santos e Doutor Pedro M. P. Góis. Obrigada pela vossa paciência, incentivo e apoio técnico. Sem a vossa ajuda não teria conseguido.

À Doutora Lúcia Gonçalves, que foi muito importante ao colaborar nesta tese com a realização dos ensaios biológicos. Agradeço também pela sua simpatia e pelas palavras amigas que me dedicou.

Agradeço ao Mestre Alexandre Pinto por me ter integrado neste trabalho de investigação, explicando-me os procedimentos que desenvolveu durante o ano anterior.

Agradeço à Doutora Maria Rosário Bronze e ao João Ferreira, que me ajudaram a caracterizar os produtos finais, através da realização de espectrometria de massa de baixa resolução.

Ao Doutor Praveen Kumar por me ter cedido dados sobre a actividade dos compostos que sintetizou, durante o seu trabalho de investigação.

A todos os colegas de laboratório, a quem tenho o privilégio de chamar amigos especialmente ao Doutor Sudarshan Ragireddy, Doutor Nuno Candeias, Doutor João Rosa, Mestre Pedro Cal, Doutora Ana Ressurreição e Mestre Carlos Ribeiro. Todos com quem trabalhei mostraram sempre disponibilidade para me auxiliar do ponto de vista técnico e científico, ao longo deste trabalho.

À Dr.^a Rita Gomes, directora técnica da farmácia Ferrão, que fez todos os possíveis para que eu conseguisse conciliar o meu trabalho com a realização desta fase dos meus estudos. Obrigada Pedro, Alexandra e Dr.^a Ana, “caros colegas!”, por serem tão compreensivos.

E finalmente, à minha família, para quem um milhão de palavras não será suficiente. Obrigada por compreenderem e aceitarem a minha “ausência”.

Resumo

A malária é uma doença infecciosa, que provoca anualmente milhões de mortes no Mundo. Actualmente, a terapêutica disponível é insuficiente para o combate da doença, pois ao longo dos anos, o parasita da malária tem desenvolvido resistência a esses fármacos, diminuindo a sua eficácia. Como tal, têm sido consideradas novas abordagens terapêuticas.

No *Plasmodium falciparum* (espécie mais letal do parasita), foi identificada uma protease de cisteína, designada por falcipaina, cuja inibição poderá interromper o ciclo de vida do parasita e, conseqüentemente, o desenvolvimento da doença. Como tal, o presente trabalho visa o desenvolvimento de moléculas inibidoras da falcipaina, que não tenham associados problemas de resistência. Para ir de encontro a esse objectivo, desenvolveram-se duas famílias distintas de compostos, nomeadamente α -diazó- β -hidroxiésteres e 3-metileno-indolin-2-onas. Nos α -diazó- β -hidroxiésteres, foram sintetizados 12 compostos, dos quais, 2 possuíam uma cadeia dipeptídica (**47a-b**), 9 possuíam anéis aromáticos ou heterociclos (**51a-i**) e 1 continha um ferroceno (**51j**). Nas 3-metileno-indolin-2-onas, foram sintetizados 2 compostos (**55a-b**), que integravam na sua estrutura um aminoácido.

Os compostos sintetizados foram testados contra a papaína, que apresenta uma elevada homologia funcional e estrutural relativamente à falcipaina. De entre os compostos α -diazó- β -hidroxiésteres (**51a-51j**) destaca-se o **51j**, que apresentando um IC₅₀ de 48 μ M e cuja estrutura integra um grupo ferroceno, que parece ter um papel promissor no desenvolvimento de antimaláricos. Das moléculas contendo 3-metileno-indolin-2-onas (**55a-b**), o **52a** é o composto com maior actividade inibitória, com um IC₅₀ de 82 μ M.

Este trabalho constitui um avanço para a descoberta de novas moléculas antimaláricas, cujo alvo terapêutico são as proteases de cisteína.

Palavras-Chave: Malária; Protease de cisteína; α -diazó- β -hidroxiésteres; 3-metileno-indolin-2-onas

Abstract

Malaria is an infectious disease which causes millions of deaths annually worldwide. Over the years malaria parasite has developed resistance to the drugs available for its treatment, reducing their effectiveness and the available therapy is inadequate to combat this disease. Hence, new therapeutic approaches are being considered.

In *Plasmodium falciparum* (the most lethal parasite specie), a cysteine protease called falcipain has been identified. Its inhibition may interrupt the parasite life cycle and, consequently, the disease development. As such, this work aims to develop molecules to inhibit falcipain, which are not associated with resistance problems. To achieve this goal, two distinct families of compounds were synthesized, namely, α -diazo- β -hydroxy esters and 3-methylene-indolin-2-ones. Regarding α -diazo- β -hydroxy esters, 12 compounds were synthesized, in which two containing a dipeptide chain (**47a-b**), 9 have aromatic rings or heterocycles (**47a-i**) and one containing a ferrocene (**51j**). In 3-methylene-indolin-2-ones, two compounds were synthesized (**55a-b**), including one amino acid in their structure.

The synthesized compounds were tested against papain, which has a higher functional and structural homology than falcipain. Amongst the α -diazo- β -hydroxy esters compounds (**51a-51j**), **51j** comprising a ferrocene group stands out, showing an IC_{50} of 48 μ M. Such ferrocene moiety seems to have a promising role in antimalarials development. In molecules containing 3-methylene-indolin-2-ones (**55a-b**), **55a** is the compound with the highest inhibitory activity with an IC_{50} of 82 μ M.

This work represents a breakthrough for the discovery of new antimalarial molecules, in which cysteine proteases are the therapeutic target.

Keywords: Malaria, cysteine protease, α -diazo- β -hydroxy esters, 3-methylene-indolin-2-ones

Índice

Índice de figuras	v
Índice de esquemas.....	vi
Índice de tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas	ix
I. Introdução teórica	1
1.1. Malária	2
1.2. Modo de transmissão	2
1.3. Terapêutica actual.....	4
1.4. Inibidores de proteases de cisteína	10
1.4.1. Diazometano e 2-diazoacetato de etilo	19
1.4.2. 3-metileno-indolin-2-onas.....	23
II. Discussão de resultados	28
2.1. Síntese de α -diazó- β -hidroxiésteres dipeptídicos	32
2.1.1. Síntese de dipéptidos <i>N</i> -protegidos	33
2.1.2. Síntese de amidas de Weinreb dipeptídicas	36
2.1.3. Síntese de aldeídos dipeptídicos	37
2.1.4. Síntese de α -diazó- β -hidroxiésteres dipeptídicos.....	39
2.2. Síntese de α -diazó- β -hidroxiésteres contendo heterociclos e anéis aromáticos.....	41
2.2.1. Actividade inibitória do α -diazó- β -hidroxiésteres contendo heterociclos e anéis aromáticos.....	49
2.3. Síntese de 3-metileno-indolin-2-onas	52
2.3.1. Actividade Inibitória dos derivados de 3-metileno-indolin-2-onas	57
2.4. Conclusão e perspectivas futuras.....	60
III. Procedimento experimental.....	64
3.1. Preâmbulo.....	66
3.2. Síntese de α -diazó- β -hidroxiésteres dipeptídicos	68

3.2.1. Síntese de dipéptidos <i>N</i> -protegidos	68
3.2.1.1. Síntese de Ácido (S)-2-((S)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-fenilpropanamido)-4-metilpentanóico (45a)	69
3.2.1.2. Síntese de Ácido (S)-2-((S)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-4-fenilbutanamido)-4-metilpentanóico (45b)	69
3.2.2. Síntese de Amidas de Weinreb dipeptídicas	70
3.2.2.1. Síntese de <i>N</i> -metil- <i>N</i> -metóxi-(S)-2-((S)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-4-fenilbutanamido)-4-metilpentanamida (46a)	71
3.2.2.2. Síntese de <i>N</i> -metil- <i>N</i> -metóxi-(S)-2-((S)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-4-fenilbutanamido)-4-metilpentanamida (46b)	71
3.2.3. Síntese de aldeídos dipeptídicos	72
3.2.3.1. Síntese de (S)-2-((S)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-fenilpropanamido)-4-metilpentanaldeído (47a).....	73
3.2.3.2. Síntese de (S)-2-((S)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-4-fenilbutanamido)-4-metilpentanaldeído (47b)	73
3.2.4. Síntese de α -diazó- β -hidroxiésteres dipeptídicos.....	74
3.2.4.1. Síntese de (4S)-4-((S)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-fenilpropanamido)-2-diazó-3-hidroxi-6-metilheptanoato de etilo (48a)	75
3.2.4.2. Síntese de (4S)-4-((S)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-4-fenilbutamido)-2-diazó-3-hidroxi-6-metilheptanoato de etilo (48b).....	75
3.3. Síntese de α -diazó- β -hidroxiésteres contendo heterociclos e anéis aromáticos	76
3.3.1. Síntese de 2-diazó-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (51a)	77
3.3.2. Síntese de 2-diazó-3-hidroxi-3-(piridin-3-il)propanoato de etilo (51b).....	77
3.3.3. Síntese de 2-diazó-3-hidroxi-3-(quinolin-3-il)propanoato de etilo (51c)	78
3.3.4. Síntese de 2-diazó-3-hidroxi-5-fenilpentanoato de etilo (51d)	79
3.3.5. Síntese de 2-diazó-3-hidroxi-3-(naftalen-2-il)propanoato de etilo (51e)	79
3.3.6. Síntese de 3-(4-bromofenil)-2-diazó-3-hidroxipropanoato de etilo (51f)	80
3.3.7. Síntese de 3-(bifenil-4-il)-2-diazó-3-hidroxipropanoato de etilo (51g)	81
3.3.8. Síntese de 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-diazó-3-hidroxipropanoato de etilo (51h).....	81
3.3.9. Síntese de 3-(4-cianofenil)-2-diazó-3-hidroxipropanoato de etilo (51i)	82
3.3.10. Síntese de 2-diazó-1-ferrocenil-3-hidroxipropanoato de etilo (51j)	83

3.4. Síntese de 3-metileno-indolin-2-onas derivadas de aminoácidos	84
3.4.1. Síntese de Amidas de Weinreb, derivadas de aminoácidos	84
3.4.1.1. Síntese de <i>N</i> -metil- <i>N</i> -metóxi-(<i>S</i>)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-fenilpropanamida (56a).....	85
3.4.1.2. Síntese de <i>N</i> -metil- <i>N</i> -metóxi-(<i>S</i>)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-4-metilpentanamida (56b).....	85
3.4.2. Síntese de aldeídos, derivados de aminoácidos	86
3.4.2.1. Síntese de (<i>S</i>)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-fenilpropanaldeído (54a)	87
3.4.2.2. Síntese de (<i>S</i>)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-4-metilpentanaldeído (54b)	87
3.4.3. Síntese de 3-metileno-indolin-2-onas derivadas de aminoácidos.....	88
3.4.3.1. Síntese de (<i>S</i>)-3-(2- <i>tert</i> -butoxicarbonilamino-3-fenilpropilideno)indolin-2-ona (55a).....	89
3.4.3.2. Síntese de (<i>S</i>)-3-(2- <i>tert</i> -butoxicarbonilamino-4-metilpentilideno)indolin-2-ona (55b)	90
IV. Referências Bibliográficas	92
V. Anexos	100
Anexo A (45a)	102
Anexo B (45b)	102
Anexo C (46a)	103
Anexo D (46b).....	103
Anexo E (51a)	104
Anexo F (51b)	106
Anexo G (51c).....	108
Anexo H (51d).....	110
Anexo I (51e).....	112
Anexo J (51f).....	114
Anexo K (51g)	116
Anexo L (51h)	118

Anexo M (51i)	120
Anexo N (51j)	122
Anexo O (55a)	124
Anexo P (55b)	126

Índice de figuras

Figura 1 - Ciclo de vida dos parasitas que provocam a malária.....	3
Figura 2 - Fármacos antimaláricos contendo uma estrutura quinolínica. <i>Álcoois quinolínicos</i> : Quinina (1), Mefloquina (3); <i>4-aminoquinolinas</i> : Cloroquina (2), Amodiaquina (4), Hidroxicloroquina (5); <i>8-aminoquinolinas</i> : Pamaquina (6), Primaquina (7)	6
Figura 3 - Fármaco antimalárico derivado do fenantreno: Halofantrina (8)	7
Figura 4 - Artemisinina (9a) e seus derivados (9b-e).....	8
Figura 5 - Outros fármacos utilizados na malária. <i>Biguanidas</i> : Proguanilo (10), Cicloguanilo (11); <i>Diaminopiridinas</i> : Pirimetamina (12), Trimetoprim (13); <i>Sulfonamidas</i> : Sulfadoxina (14)	9
Figura 6 - Inibidores utilizando aldeídos que contêm uma cadeia peptídica: Mu-Leu-homoPhe-CHO (15); e derivados de α -cetoamidas: Mu-Leu-homoPhe-Phe-(CO)-NH ₂ (16).....	12
Figura 7 - Inibidor utilizando fluorometilcetonas: Z-Phe-Arg-CH ₂ F (17)	13
Figura 8 - Inibidor de proteases de cisteína: E64 (18).....	14
Figura 9 - Inibidores utilizando peptidilaziridinas: Aziridina-2-carbonílica (19); Derivados de ácidos: Arizidina 2,3-dicarboxílica (20a-b).....	15
Figura 10 - Inibidor peptidomimético baseado na estrutura da 1,4-benzodiazepina (21a-b)	16
Figura 11 - Inibidor peptidomimético baseado na estrutura 1,4-benzodiazepina em que foi inserido uma vinilsulfona (22).....	17
Figura 12 - Inibidores utilizando uma vinilsulfona e uma componente peptídica: Mu-Phe-homoPhe-VSPH (23); N-Pipu-Leu-homoPhe-VSC ₁₀ H ₈ (24).....	18
Figura 13 - Moléculas contendo na sua estrutura o grupo diazo: Azaserina (25); Cbz-Phe-CH ₂ N ₂ (26); Diazometano (27); 2-diazoacetato de etilo (28).....	19
Figura 14 - Exemplos de moléculas contendo o oxindole e que apresentam propriedades farmacológicas: Antiviral (34); Antihipertensor (35); Indutor de sono (36); Antibacteriano (37).	23
Figura 15 - Inibidor da pfmrk (38)	24
Figura 16 - Fármaco antimalárico que está a ser desenvolvido: Ferroquina (SR97193) (52).	48

Índice de esquemas

Esquema 1 - Mecanismo inibitório proposto para as diazometilcetonas	20
Esquema 2 - α -diazó- β -hidroxiésteres (29a-k) e α -diazó- β -cetoésteres (30a-k) sintetizados anteriormente	21
Esquema 3 - Mecanismo geral da condensação da 3-metileno-indolin-2-ona substituída (39) com diferentes intermediários <i>N</i> -protegidos (40)	25
Esquema 4 - Apresentação dos compostos sintetizados no presente trabalho	30
Esquema 5 - Esquema geral de síntese de α -diazó- β -hidroxiésteres dipeptídicos (48a-b)	33
Esquema 6 - Mecanismo de activação de ácidos carboxílicos utilizando TBTU (49) ..	34
Esquema 7 - Esquema geral da hidrólise do éster (44a-b) utilizando NaOH	35
Esquema 8 - Esquema geral da síntese de amidas de Weinreb (46a-b)	37
Esquema 9 - Mecanismo de redução das amidas de Weinreb (46a-b)	38
Esquema 10 - Esquema geral da síntese de α -diazó- β -hidroxiésteres (48a-b)	39
Esquema 11 - Mecanismo de diazotização utilizando tosilazida (49)	41
Esquema 12 - Mecanismo da adição aldólica que ocorre entre aldeídos e EDA (28) ..	42
Esquema 13 - Esquema geral da síntese de α -diazó- β -hidroxiésteres (51a-i), a partir de aldeídos comercialmente disponíveis (50a-i)	43
Esquema 14 - Desenho de novas estruturas 3-metileno-indolin-2-onas, considerando estruturas anteriormente sintetizadas	52
Esquema 15 - Esquema geral da condensação aldólica da indolin-2-ona (53) com o aldeído	53
Esquema 16 - Mecanismo proposto para a síntese de 3-metileno-indolin-2-onas	53
Esquema 17 - Esquema geral de síntese de 3-metileno-indolin-2-onas (55a-b)	54

Índice de tabelas

Tabela 1- Valores de IC ₅₀ para a papaína, relativos aos compostos 29h-29k e 30c ...	22
Tabela 2- Valores de IC ₅₀ para a falcipaina 2 e para uma estirpe resistente à cloroquina (<i>P. Falciparum</i> W2), relativos aos compostos 41a-38i	26
Tabela 3- Valores de IC ₅₀ para a papaína relativos às moléculas obtidas pela adição do EDA (28) aos aldeídos.....	50
Tabela 4- Valores de IC ₅₀ para a papaína relativos às moléculas obtidas (55a-b) pela condensação aldólica dos aldeídos derivados de aminoácidos com indolin-2-ona	57

Lista de Abreviaturas

μmáx	Frequência máxima de absorção (em infravermelho)
ADN	Acido Desoxirribonucleico
Arg	Arginina
Boc	<i>tert</i> – butoxicarbonilo;
Bu	<i>n</i> -Butilo
Cbz	Carboxibenzilo;
CCF	Cromatografia em camada fina
CA	“ <i>Papain-like</i> ”
Cys	Cisteína
Cf	Carbono do ferroceno
DBU	1,8 – Diazobiciclo-undec-7-eno;
DCM	Diclorometano
d	Dupleto
DHFR	Di-hidrofolato redutase
DHPS	Di-hidropteroato sintetase
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> - Dimetilformamida;
EDA	2-Diazoacetato de etilo
f	forte
His	Histidina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (do Inglês: “Human Immunodeficiency Virus”)
HOBt	Hidroxibenzotriazolo;
homoPhe	Homofenilalanina

IC₅₀	Concentração inibitória média (do Inglês: “half maximal inhibitory concentration”)
IV	Infra-Vermelho;
J	Constante de acoplamento
I	larga
LDA	Diisopropilamida de Lítio;
Leu	Leucina;
m/z	Massa/carga
m	Multiplete
MS	Espectrometria de Massa (do Inglês: “Mass Spectrometry”)
Mu	Morfolina
MW	Microondas (do Inglês “Microwave”);
N.T.	Não testado
N-Pipu	<i>N</i> -metil piperazina
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
Pfcrt	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance related transporter
Pfmdr1	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance gene 1
Ph	Fenil
Phe	Fenilalanina
Ppm	Partes por milhão
q	quadruplete
r.f.	Refluxo
RMN-¹³C	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono

RMN-¹H	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton
s	Singleto
t	Tripleto
t.a.	Temperatura ambiente
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilurônio tetrafluoroborato;
THF	Tetrahidrofurano;
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
VS	Vinilsulfona
X^{Ox}	Onde “Ox” significa Oxindole

I. Introdução teórica

1.1. Malária

A malária é considerada uma das mais importantes doenças tropicais provocadas por parasitas em todo o mundo.¹ De facto, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), esta patologia infecciosa humana contagia cerca de 243 milhões de pessoas por ano e provoca aproximadamente 863 000 de mortes anuais.¹⁻⁴ Estes valores alarmantes são perfeitamente justificados, considerando que mais de metade da população mundial vive em áreas onde a malária é endémica (regiões tropicais e subtropicais da África, América do Sul e Ásia).⁵ Por outro lado, outros factores como o aumento de viagens a nível global, o aumento da migração de pessoas das zonas endémicas e a alteração do clima, têm proporcionado o aumento da incidência de alguns casos em países normalmente livres da patologia.^{3, 6}

1.2. Modo de transmissão

A transmissão da malária (Figura 1), está dependente da presença do vector natural da doença: mosquito fêmea do género *Anopheles*.^{5, 7} Este mosquito é responsável pela inoculação de parasitas sob a forma de esporozoítos (presentes na sua glândula salivar), para o sangue do indivíduo a infectar durante o processo de hemofagia.^{3, 7} Passado cerca de uma hora após a picada do mosquito, os esporozoítos chegam ao fígado, através do sistema linfático e entram nos hepatócitos, começando a multiplicar-se em merozoítos exoeritrócitos.^{3, 8} Após cerca de uma semana, esses merozoítos rompem os hepatócitos onde estão contidos e invadem os eritrócitos transformando-se em trofozoítos, que mais tarde, ao terem consumido os produtos da degradação da hemoglobina, originam os esquizontes, que são constituídos por vários merozoítos.^{3, 9} Finalmente, ocorre a lise do eritrócito, com a consequente libertação dos merozoítos, cuja função passa pela contaminação de novos eritrócitos, de forma a iniciar um novo ciclo.^{3, 7} Os sintomas da doença são provocados pelos parasitas assexuados que destroem as hemácias, no entanto alguns merozoítos diferenciam-se em gametócitos (forma sexuada do parasita),

que apesar de não serem responsáveis pelos sintomas da doença, possuem um papel importante na conclusão do ciclo, pois poderão ser transmitidos ao mosquito que irá funcionar como vector.^{3, 10}

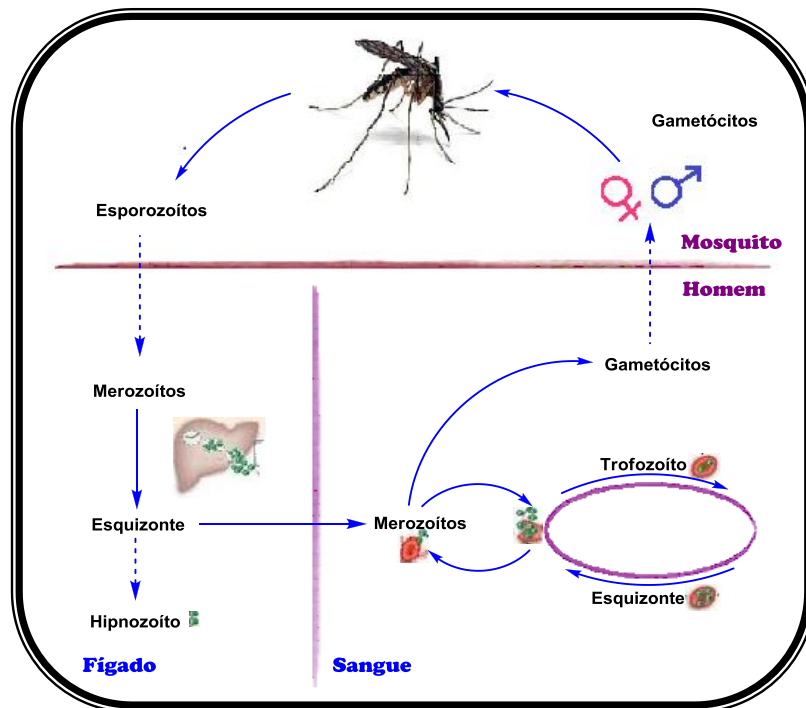


Figura 1 - Ciclo de vida dos parasitas que provocam a malária

A malária é causada nos seres humanos por cinco espécies distintas de parasitas do género *Plasmodium*, são elas: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum* e a *P. knowlesi*.¹¹ Em termos de mortalidade a *P. falciparum* é considerada a espécie mais letal, sendo juntamente com a *P. vivax*, referenciada como a responsável por mais de 95% dos casos de malária em todo o mundo. Para além disso, o desenvolvimento de resistências à terapêutica antimalárica tem sido observada mais frequentemente na *P. falciparum*, ainda que em alguns casos esporádicos também sejam reportados episódios de resistência ao *P. vivax*.^{5, 12, 13}

Esta ineficácia terapêutica, que atravessa todas as classes de antimaláricos tem promovido o ressurgimento da malária ao contrário do que seria espectável

há algumas décadas atrás, quando se desenvolveram vários fármacos, como os antifolatos, as biguanidas, as sulfonamidas e as sulfonas.⁵

Assim sendo, e apesar de actualmente terem sido adoptadas terapias combinadas de artemisinina, no sentido de tentar evitar o desenvolvimento de novas estirpes resistentes a este antimalárico, é urgente desenvolver novos fármacos que vão de encontro ao combate desta patologia, preferencialmente direccionados para novos alvos.^{4, 5, 9}

1.3. Terapêutica actual

A terapêutica antimalárica já era utilizada de forma empírica por comunidades Índias da América do Sul, muito antes de existir qualquer tratamento disponível na Europa, ao utilizarem a casca da *Chinchona* no tratamento desta doença. De facto, só em 1639 é que os Europeus tiveram acesso a esta planta, quando missionários Jesuítas a importaram, tendo-se tornado rapidamente o principal tratamento para as febres. Mais tarde, em 1820, graças ao trabalho desenvolvido por dois químicos franceses, Pierre Joseph Pelletier e Joseph Bienaime Caventou descobriu-se que o princípio activo presente na casca da *Chinchona* era o alcalóide quinina (**1**).^{14, 15} A partir desse momento, o seu uso implementou-se um pouco por todo o mundo e permaneceu como único quimioterápico no combate à malária até meados do século passado.¹⁶ Posteriormente, com o surgimento de novos compostos menos tóxicos e com o surgimento de estirpes resistentes, houve um decréscimo da sua utilização.^{14, 15, 17}

A quinina (**1**) pertence à família das quinolinas, que engloba as 4-aminoquinolinas, 8-aminoquinolinas e os álcoois quinolínicos. O mecanismo de acção desta família ainda não é totalmente entendido, mas sabe-se que actuam ao nível do ciclo eritrocítico do *P. falciparum* e *P. vivax*. Algumas hipóteses apresentadas pressupõem que ocorre uma ligação directa ao grupo heme da hemoglobina, inibição da síntese de proteínas ou intercalação com o ADN. No entanto, apesar das várias teorias expostas, existe uma mais

provável: existe uma acumulação destas bases fracas no lisossoma ácido do parasita, e sua posterior ligação à ferriprotoporfirina-IX, evitando assim a destoxificação do parasita. Tal facto ocorre devido à incapacidade em converter a ferriprotoporfirina-IX, que é um produto tóxico da digestão da hemoglobina, em hemozoína, que é um polímero insolúvel, inerte e não tóxico. Com a inevitável acumulação da ferriprotoporfirina-IX dentro dos vacúolos do parasita, ocorre a sua morte.^{14, 17, 18}

De entre a família das quinolinas (Figura 2), destaca-se a cloroquina (2), cuja acção terapêutica foi das mais utilizadas na profilaxia e tratamento da malária. Esta preferência baseia-se no facto de raramente produzir efeitos secundários graves durante o tratamento profilático e de ser um esquizonticida eficaz na supressão da doença. Infelizmente, a sua utilização na profilaxia levou ao desenvolvimento de estirpes resistentes, provocadas por mutações do gene *pfmdr1* e do gene *pfcr1*.^{14, 17, 19}

Em substituição à cloroquina (2), está disponível a mefloquina (3) (derivado de 2), que apesar de ser activa em quantidades muito menores relativamente à quinina (1) (menos de um décimo da dose), também pressupõe vários efeitos secundários.²⁰ Estes efeitos, que vão desde complicações gastrointestinais a efeitos psicológicos,²⁰ são temporários. No entanto, a sua ocorrência invalida a administração deste fármaco a pessoas com história de epilepsia ou desordens psiquiátricas. Por outro lado, ainda que se trate de um fármaco relativamente novo, já existem relatos de resistência. Outras alternativas terapêuticas, face à resistência à cloroquina (2), são a administração da amodiaquina²¹ (4) e a hidroxicloroquina (5). Não obstante, a sua acção antimalárica é menos efectiva, para além da amodiaquina (4) ser mais tóxica que a própria cloroquina (2).^{14, 17}

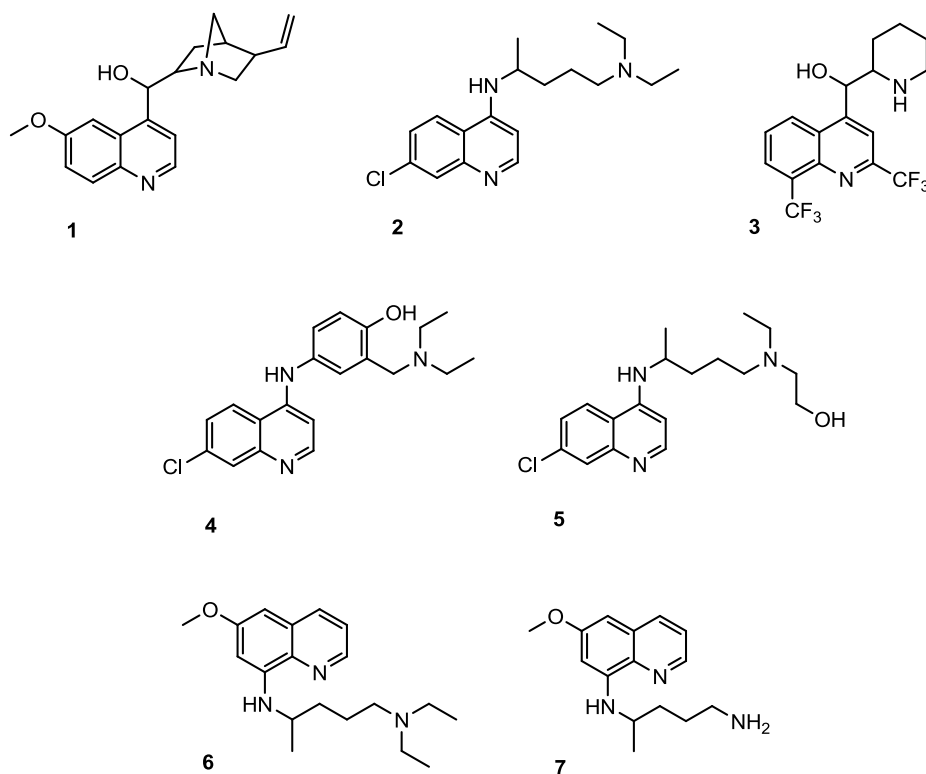
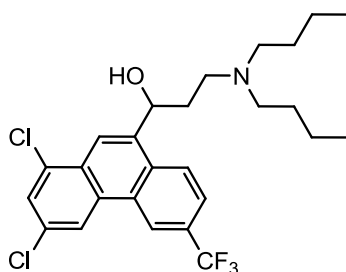


Figura 2- Fármacos antimaláricos contendo uma estrutura quinolínica. *Álcoois quinolínicos:* Quinina (1), Mefloquina (3); *4-Aminoquinolinas:* Cloroquina (2), Amodiaquina (4), Hidroxicloroquina (5); *8-Aminoquinolinas:* Pamaquina (6), Primaquina (7)

As 8-aminoquinolinas (Figura 2), constituem a única classe de antimaláricos que actuam ao nível do estágio sexuado do parasita, sendo portanto, os únicos fármacos bloqueadores da transmissão da doença. Adicionalmente, são eficazes contra formas teciduais primárias e secundárias do parasita. A pamaquina (6), foi a primeira substância desta classe a ser sintetizada em 1926, na Alemanha.²² Actualmente, a substância que é mais conhecida e mais utilizada é a primaquina (7), cuja síntese ocorreu pela primeira vez em 1946, nos Estados Unidos.²³ A primaquina (7) é muito útil no combate aos hipnozoítos no *P. falciparum* e *P. vivax*. e, normalmente é associada a um agente esquizonticida como a cloroquina (2) e a amodiaquina (4).^{14, 17}

Ainda em alternativa à cloroquina existe a halofantrina (8) (derivado do fenantreno), cuja acção terapêutica é bastante eficaz (Figura 3) e tem vindo a ser utilizada desde 1988.²⁴ A sua utilização infelizmente, também prevê o aparecimento de distúrbios gastrointestinais, tendo sido descritos episódios de

desenvolvimento de resistência, inclusive casos de resistência cruzada com a mefloquina (**3**).^{14, 17} Para além disso, também é sabido que este fármaco possui propriedades cardiotóxicas tendo, por isso, caído em desuso desde 1993, quando foi relatado o primeiro caso de óbito devido a esse efeito secundário.²⁴



8

Figura 3- Fármaco antimalárico derivado do fenantreno: Halofantrina (**8**)

Um outro grupo de antimaláricos, não menos importante, pertence aos compostos sesquiterpénicos (Figura 4). O primeiro sesquiterpeno isolado foi a artemisinina (**9a**), em 1972, a partir da erva medicinal chinesa *Artemisia annua*. A artemisinina (**9a**) tem sido utilizada pelos Chineses desde há mais de 2000 anos no tratamento das febres e actua essencialmente como esquizonticida.^{17, 25} De acordo com a literatura, a sua acção é muito rápida e é mais potente que a cloroquina (**2**) e a quinina (**1**).¹⁴ Também se pensa que este composto tem uma acção gametocida, limitando igualmente a transmissão da doença, tal como acontece com as 8-aminoquinolinas. No entanto, tal efeito ainda não é claro, pois é possível que a sua actuação rápida sob as formas sanguíneas do parasita, impeça a formação dos gametócitos. A implementação bem sucedida deste composto no tratamento da doença, foi a base para a concepção de vários compostos análogos, como o artesunato de sódio (**9b**), a diidroartemisinina (**9c**), o arteéter (**9d**) e o arteméter (**9e**).^{14, 17}

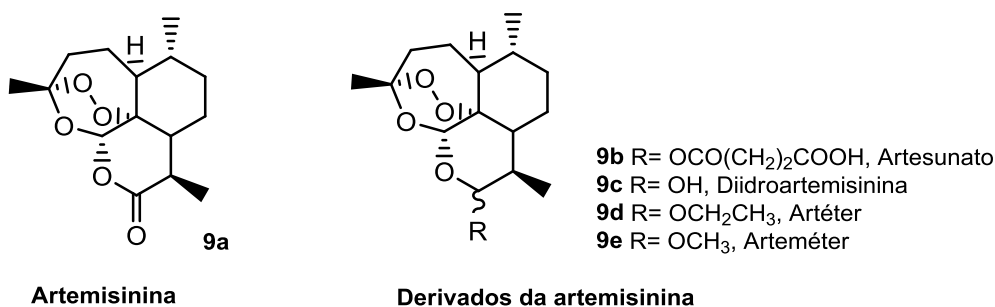


Figura 4- Artemisinina (**9a**) e seus derivados (**9b-e**)

Estes compostos apresentam uma rápida absorção oral e boa distribuição tecidual e são do ponto de vista estrutural muito semelhantes: todos apresentam uma ponte de peróxido sobre o anel de 7 membros. De acordo com cálculos elaborados por Halibour e seus colaboradores, a ponte de peróxido quebra-se por reacção do fármaco com o grupo heme, presente dentro do vacúolo do parasita ou de origem exógena, gerando radicais que vão alquilar ou modificar covalentemente as proteínas do parasita. Outra teoria também considerada defende que o mecanismo de acção é similar ao das quinolinas onde o fármaco se acumula nos vacúolos digestivos do parasita, interferindo na formação da hemozoína. De referir ainda, que apesar de estes fármacos actualmente continuarem a ter muito sucesso, já existem relatos da ocorrência de resistência a compostos sesquiterpénicos em algumas províncias da China, e mais recentemente na fronteira entre a Tailândia e o Camboja, sendo por isso importante adoptar uma terapêutica combinada de forma a prevenir o seu alastramento.^{14, 17, 26}

Por último, também está disponível outra família de antimaláricos: os antifolatos (Figura 5). Nesta família incluem-se alguns antibióticos com actividade antimalárica, bem como outros fármacos que não estão incluídos nas duas famílias descritas anteriormente, como as biguanidas [proguanilo (**10**) e cicloguanilo (**11**)], as diaminopirimidinas [pirimetamina (**12**) e trimetoprim (**13**)] e as sulfonamidas (sulfadoxina (**14**)).^{14, 17}

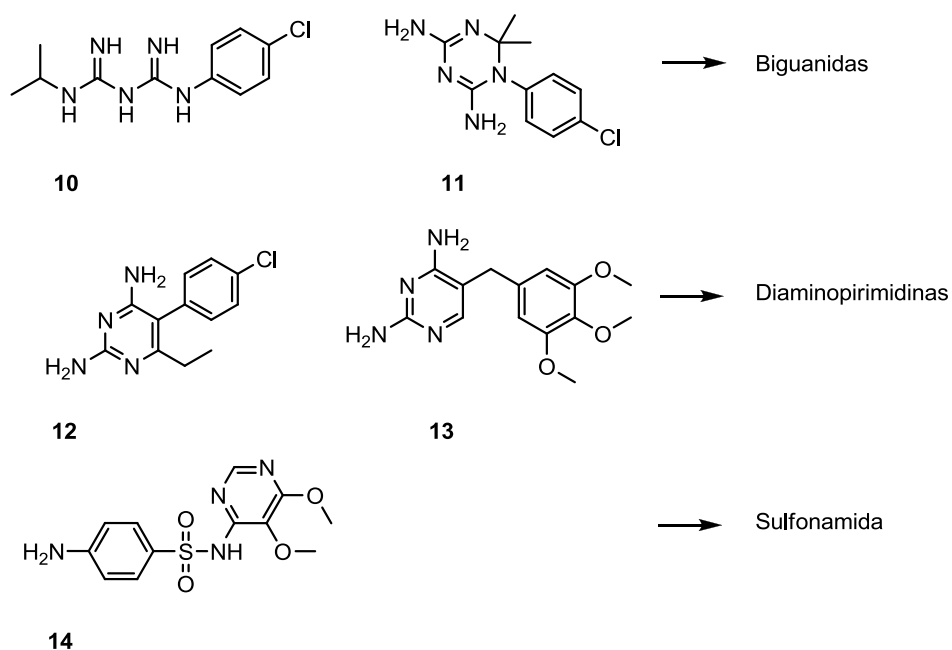


Figura 5 - Outros fármacos utilizados na malária. *Biguanidas*: Proguanilo (**10**), Cicloguanilo (**11**); *Diaminopirimidinas*: Pirimetamina (**12**), Trimetoprim (**13**); *Sulfonamidas*: Sulfadoxina (**14**)

O mecanismo de acção ocorre por inibição da biossíntese do folato, que é um factor de crescimento essencial para o parasita. Esta inibição pode suceder pela inibição de duas enzimas distintas: a di-hidropteroato sintetase (DHPS) e a di-hidrofolato redutase (DHFR), cuja inibição ocorre por acção de antifolatos do tipo I e antifolatos do tipo II, respectivamente. Ainda que estes fármacos actuem como excelentes esquinzonticidas no sangue, a sua utilização tem decaído, pois para além de os parasitas terem vindo a desenvolver resistência, muitos dos antifolatos conhecidos são tóxicos e apresentam pouca tolerância oral e fraca absorção. A sua utilização, não obstante, tem sido considerada para fins terapêuticos em associação com outros antimaláricos.^{14, 17}

1.4. Inibidores de proteases de cisteína

A comunidade científica tem estudado várias hipóteses para o desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos. Uma das alternativas consiste na síntese de novas substâncias, cuja estrutura seja inovadora, de forma a tentar obter um antimalárico efectivo e livre de resistências. A sequenciação do genoma do *P. falciparum*, que foi publicado em 2002 ilustra claramente este esforço no sentido de descobrir novas formas de combate à doença, já que desse modo é possível definir estratégias de intervenção a novos alvos, que de outro modo não seriam conhecidos ou até mesmo apostar na manipulação genética.⁵ Uma estratégia que poderá ser efectiva no combate à malária corresponde ao desenvolvimento de inibidores de proteases do parasita, pois graças à descodificação do genoma do *P. falciparum*, foi possível determinar que este protozoário terá 92 proteases, entre os quais estão presentes as proteases de serina e de cisteína, também conhecidas por plasmepsinas e falcipainas, respectivamente.^{4, 27} Estas proteases, de acordo com alguns estudos desenvolvidos, são determinantes para a ruptura do eritrócito e subsequente reinvasão eritrocítica, bem como para a degradação da hemoglobina necessária à maturação dos trofozoítos a esquizontes. Tal facto poderá ter um papel importante no tratamento da malária pois, tal como foi explicado anteriormente, a manifestação clínica da malária ocorre durante o ciclo eritrocítico, em que a hemácia invadida acaba por sofrer uma ruptura libertando merozoítos, que por sua vez irão invadir mais eritrócitos.⁴

De acordo com a literatura disponível, a actividade proteolítica parece ser indispensável na destruição do citoesqueleto do eritrócito, pois este é constituído por uma rede complexa de proteínas. Adicionalmente, também parece ter um papel preponderante no processamento de proteínas do parasita, que ocorre durante o ciclo intraeritrocítico.⁴ No entanto, apesar de todas estas suposições e de se saber que a presença de inibidores de proteases de serina e cisteína, bloqueiam a ruptura e invasão dos eritrócitos, o papel das diferentes proteases no desenvolvimento da patologia ainda não é totalmente claro.^{4, 27}

Das 30 proteases de cisteína que se prevêem estar presentes no *P. falciparum*, destacam-se a falcipaína 1, falcipaínas 2 e 2', e a falcipaína 3, que pertencem ao clã CA e parecem estar envolvidas neste estágio da doença (ciclo eritrocítico), sendo por isso apontadas como alvos prováveis para o desenvolvimento de novos fármacos.^{27, 28} O desenvolvimento de inibidores destas enzimas no entanto não é fácil, pois a sua presença difundida por todos os reinos, o desconhecimento exacto do seu mecanismo catalítico e o facto de existir uma alta conservação dos resíduos do centro activo das enzimas dentro da mesma classe de proteases, dificulta o desenho de um inibidor que seja eficaz apenas para uma protease em particular.²⁷

Uma das opções que está a ser considerada actualmente, é a utilização de segmentos da própria enzima a inibir, designados de pró-péptidos. De acordo com alguns estudos a utilização de inibidores usando pró-domínios cognatos à enzima-alvo tem provocado a sua inibição com um índice de especificidade elevado.²⁷ Este tipo de intervenção está a ser utilizado em proteases do *P. falciparum*, e tem apresentado resultados promissores. Actualmente, sabe-se que existe uma pró-região conhecida por PP1, localizada na posição de resíduos 89 a 75 da falcipaína 2, que é constituída por 15 aminoácidos e que tem apresentado inibição *in vitro* dessa enzima, impedindo o crescimento e desenvolvimento do parasita.²⁷

Outra alternativa, não menos interessante, consiste na identificação dos inibidores intrínsecos à falcipaína, cujo papel consiste em auto-regular a sua actividade e assim assegurar a sobrevivência do parasita. De acordo com a comunidade científica, este conhecimento poderá permitir o desenvolvimento de substâncias que impeçam o bom funcionamento dos inibidores naturais alterando o ciclo de vida do parasita e contribuindo, dessa forma, para o combate à malária. O trabalho desenvolvido nesta área por Rosenthal, permitiu-lhe identificar um inibidor endógeno da falcipaína 2 e 3, reversível e potente: a Falstatina.²⁸ O qual está presente em várias formas dos parasitas, nomeadamente nos esquizontes e merozoítos, no entanto, não está presente nos trofozoítos, que é o estágio em que a actividade das proteases de cisteína é máxima. Tal facto, levou os investigadores ao tratamento dos esquizontes “maduros” com anticorpos que bloqueavam a actividade da falstatina na

tentativa de perceber se estes se transformavam em merozoítos prontos a invadir novos eritrócitos, o que não se veio a verificar pois a invasão eritrocítica diminuiu substancialmente. Como tal, a aposta no desenvolvimento de novos antimaláricos poderá passar pelo desenvolvimento e aperfeiçoamento de substâncias que actuem ao nível dos inibidores endógenos do *P. falciparum*.²⁸

Acredita-se, no entanto, que o caminho para a descoberta de novos tratamentos poderá passar pela pesquisa de novos inibidores direccionados para as proteases de cisteína, apesar dos inconvenientes anteriormente descritos. Como tal, vários compostos têm sido sintetizados e testados ao longo dos anos.

Dois dos primeiros grupos a serem sintetizados com vista a desenvolver moléculas inibidoras das proteases de cisteína pertencem aos aldeídos e aos derivados α -cetoamida, que possuem na sua constituição uma cadeia peptídica. Estes inibidores reversíveis possuem o inconveniente de não serem selectivos para as proteases de cisteína, pois também inibem as proteases de serina.²⁹ Ainda assim, estas moléculas demonstraram possuir excelentes capacidades inibitórias relativamente à falcipaina 2, com valores de IC_{50} de 1 μ M para algumas moléculas, nomeadamente para o aldeído Mu-Leu-homoPhe-CHO (**15**) e para a α -cetoamida Mu-Leu-homoPhe-Phe-(CO)-NH₂ (**16**) (Figura 6).⁵

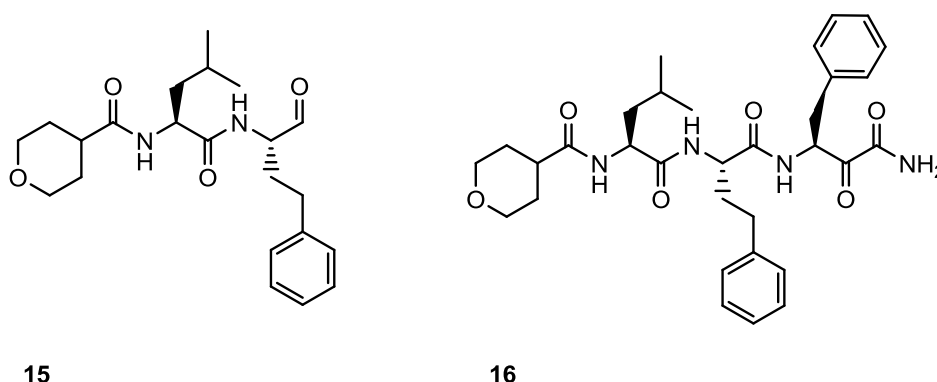


Figura 6- Inibidores utilizando aldeídos que contêm uma cadeia peptídica: Mu-Leu-homoPhe-CHO (**15**); e derivados de α -cetoamidas: Mu-Leu-homoPhe-Phe-(CO)-NH₂ (**16**)

Na década de 60, iniciou-se o desenvolvimento de um conjunto de inibidores irreversíveis, selectivos e altamente reactivos: o das fluorometilcetonas. As fluorometilcetonas pertencem ao grupo das halometilcetonas e caracterizam-se por ter na sua constituição um grupo halogenado (neste caso, um átomo de flúor). Neste grupo também estão incluídas algumas moléculas que possuem uma actividade elevada contra a falcipaina-2. De entre estas, destaca-se a benziloxycarbonil (Z)-Phe-Arg-CH₂F (**17**) (Figura 7), cujo poder inibitório contra a falcipaina-2 (IC₅₀= 0,36 µM), permitiu em estudos utilizando trofozoítos, bloquear a degradação da hemoglobina (IC₅₀= 0,10 µM) e inibir o desenvolvimento do parasita da malária em cultura (IC₅₀= 64,00 µM). Para além disso, demonstrou não ser tóxico em quatro linhas de culturas de células humanas.⁵ No entanto, mais estudos deverão ser feitos no sentido de confirmar a sua atoxicidade, pois a implementação de fluorometilcetonas na terapêutica humana podem provocar a metabolização destas substâncias a fluoroacetato, provocando a interrupção do ciclo de Krebs. Esta interrupção, por sua vez, provoca efeitos dramáticos no ser humano, que podem ir desde sequelas graves e irreversíveis até à morte do indivíduo.³⁰

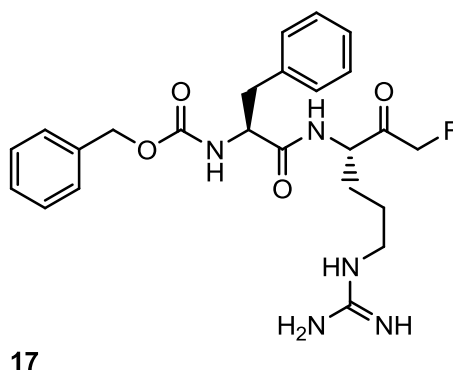


Figura 7- Inibidor utilizando fluorometilcetonas: Z-Phe-Arg-CH₂F (**17**)

Entretanto foi desenvolvido um outro inibidor, o E64 (**18**), que ao longo dos anos tem sido muito utilizado como protótipo para o desenvolvimento de novas moléculas. O E64 (**18**) (Figura 8) foi o primeiro péptido epóxi-succinil isolado, em 1978, e trata-se de um inibidor irreversível e específico das proteases do clã CA, apresentando um poder inibitório elevado de 0,015 µM e de 0,075 µM para a falcipaina 2 e 3, respectivamente.⁵ Infelizmente, existe uma

desvantagem muito importante associada a este inibidor - a sua fraca capacidade de penetração celular. Assim sendo, têm sido desenvolvidos vários derivados destes epóxidos, alterando os seus substituintes e mantendo o grupo epóxi-succinil, sendo esta última estrutura determinante para a sua actividade.

5, 31, 32

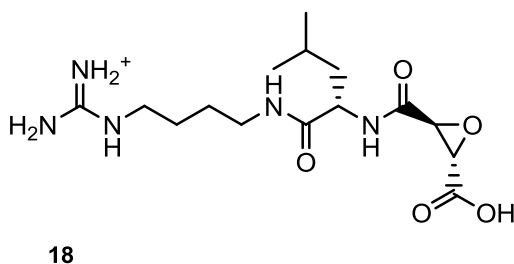


Figura 8- Inibidor de proteases de cisteína: E64 (**18**)

Um análogo do E64 (**18**) que poderá vir a desempenhar um papel importante no desenvolvimento de fármacos antimaláricos, pertence às peptidilaziridinas (Figura 9), que são inibidoras irreversíveis e selectivas das proteases de cisteína.³³ O seu mecanismo de acção ainda não está completamente esclarecido, no entanto, prevê-se que seja idêntico ao dos epóxidos, mesmo considerando que alguns factores, como o pH do meio, a selectividade e a própria reactividade apresentem grandes diferenças. De facto, a alteração dessas propriedades relativamente ao inibidor E64 (**18**), poderá ter um efeito benéfico na tentativa de contornar os problemas que estão associados à penetração celular. Recentemente várias aziridinas foram desenvolvidas e testadas contra a falcipaina-2 e 3, tendo apresentado valores promissores para a inibição de ambas as enzimas.⁵ De facto, moléculas cujas estruturas estão representadas na Figura 9 apresentaram valores de IC₅₀ de 2,2 µM (**19**), 0,079 µM (**20a**) e de 0,25 µM (**20b**), contra a falcipaina 2, e de 5,4 µM (**20a**) e 39,8 µM (**20b**), contra a falcipaina 3.⁵ Estes resultados são interessantes, pois não sendo tão eficientes quanto os do E64 (**18**) para as proteases testadas, abriram um novo rumo para a síntese de inibidores, com uma biodisponibilidade possivelmente muito superior à do seu protótipo.

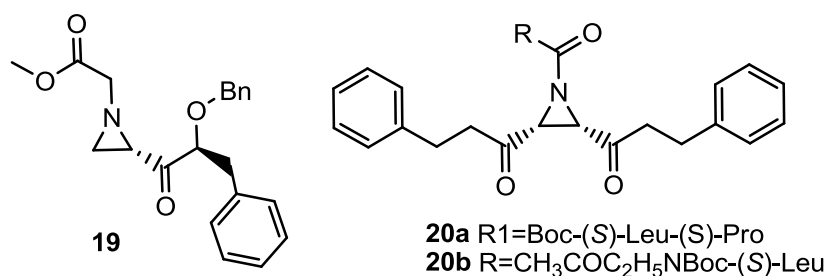


Figura 9- Inibidores utilizando peptidilaziridinas: Aziridina-2-carbonílica (**19**); Derivados de ácidos: Arizidina 2,3-dicarboxílica (**20a-b**)

Uma outra alternativa, que tem sido discutida, para o desenho de inibidores de proteases de cisteína, consiste no desenvolvimento de peptidomiméticos. Estas estruturas resultam da inserção da conformação definida de um péptido numa estrutura rígida, de forma a mimetizar a estrutura secundária das proteínas. Este tipo de intervenção tem demonstrado apresentar várias vantagens, pois ao se utilizar uma estrutura rígida de reconhecida utilidade farmacológica, é possível melhorar as propriedades do inibidor sintetizado (boa biodisponibilidade oral, boa tolerância e dimensão molecular adequada) e, simultaneamente, eliminar os problemas associados à utilização de péptidos, como a elevada susceptibilidade à degradação proteolítica e a baixa absorção ao nível das membranas celulares. Actualmente, está a ser estudada a inserção de uma benzodiazepina, que pertence a um grupo de fármacos extensamente conhecidos e com as propriedades farmacocinéticas ideais para o desenho de um inibidor efectivo do ponto de vista bioquímico. De acordo com a literatura disponível, alguns compostos miméticos sintetizados com o intuito de inibir proteases de cisteína têm demonstrado ser capazes de o fazer, com valores de IC₅₀ de 8,2 µM (**21a**) e 8,7 µM (**21b**), contra a falcipaina 2 e valores de 11,2 µM (**21a**) e de 25,9 µM (**21b**), contra a falcipaina 2' (Figura 10).⁵

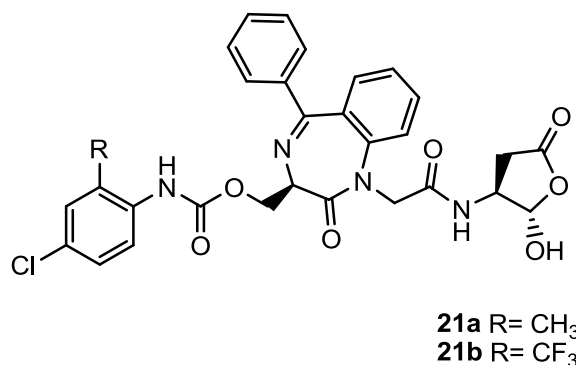
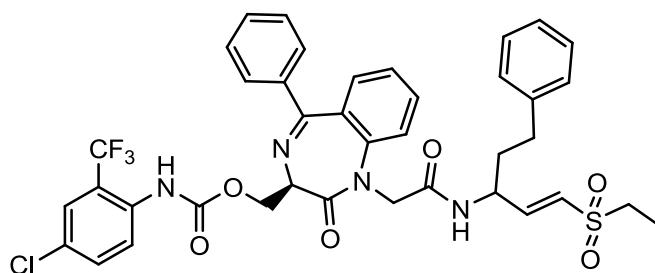


Figura 10- Inibidor peptidomimético baseado na estrutura da 1,4-benzodiazepina (**21a-b**)

Estes valores demonstraram que apesar da sua capacidade inibitória ser elevada, esta ainda é inferior à demonstrada pelo E64 (**18**), e alguns dos seus análogos, como o **19**, **20a** e **20b**.⁵ Tal conclusão, tem levado alguns cientistas a tentar inserir nestas moléculas grupos de conhecida importância na inibição de proteases de cisteína - como aceptadores de Michael - para otimizar os resultados até agora obtidos.³² Nesse sentido, já estão descritas algumas moléculas peptidomiméticas, que possuem estes grupo, como é exemplificado pelo composto **22** (Figura11), o qual resultou da inserção de uma vinilsulfona em substituição do aldeído aspartil na posição P₁. Este novo composto demonstrou ser capaz de inibir a enzima, quando submetido a testes biológicos face ao *P. falciparum*, com um IC₅₀ de 9,1 µM, significando, então, que a sua utilização poderá vir a ser muito útil no futuro.



22

Figura 11- Inibidor peptidomimético baseado na estrutura 1,4-benzodiazepina em que foi inserido uma vinilsulfona (**22**)

Entretanto, as vinilsulfonas (Figura 12), que já foram abordadas durante a descrição dos inibidores peptidomiméticos, também têm vindo a ser utilizadas em moléculas peptídicas.³⁴ De facto, estes aceitadores de Michael, que se caracterizam por se ligarem covalentemente à falcipaina-2 por adição irreversível do grupo tiol da Cys-42 à vinilsulfona electrofílica, têm vindo a ter muito sucesso, já que são moléculas muito estáveis que necessitam da “maquinaria” da protease de cisteína para serem activadas (de outra forma não são reactivas com os nucleófilos). Esta particularidade confere-lhes especificidade relativamente a outras proteases, aumentando a sua relevância no desenvolvimento de um novo antimalárico. Actualmente são conhecidas algumas estruturas que demonstraram possuir uma capacidade inibitória efectiva contra a falcipaina 2, nomeadamente a Mu-Phe-homoPhe-VSPH (**23**), cujo IC_{50} é de 0,08 μ M para a falcipaina 2. Após a síntese deste composto foi ainda sintetizada uma outra molécula idêntica: o *N*-Pipu-Leu-homoPhe-VSC₁₀H₈ (**24**), em que se introduziram alterações pontuais, no sentido de verificar a sua efectividade *in vivo*, nomeadamente a substituição do grupo de morfolina para o grupo de *N*-metil piperazina. Esta alteração que visou aumentar a solubilidade do composto e a sua biodisponibilidade, juntamente com a substituição do grupo benzil vinilsulfona pelo naftil vinilsulfona, demonstrou possuir efeitos benéficos, pois inibiu a degradação da hemoglobina, bem como o desenvolvimento e a actividade metabólica de uma cultura de *P. falciparum*, em quantidades nanomolares. Para além disso quando este inibidor foi administrado oralmente em ratinhos Swiss Webster,

observou-se que travou a progressão da doença, tendo curado 40% da população em estudo.³⁵

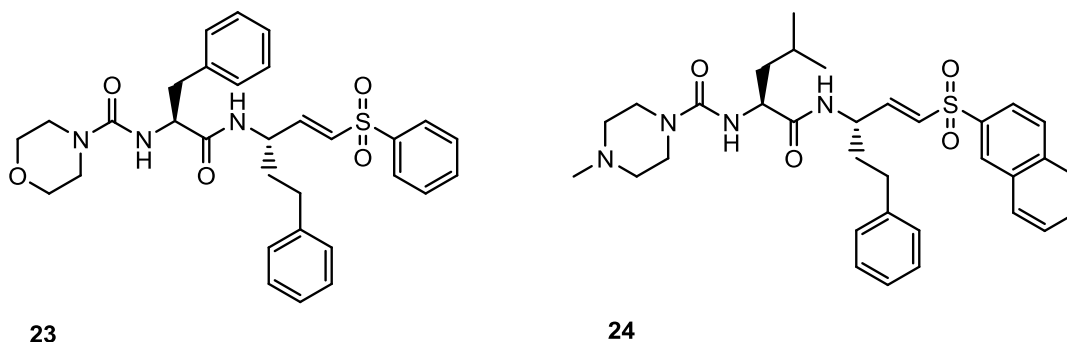


Figura 12- Inibidores utilizando uma vinilsulfona e uma componente peptídica: Mu-Phe-homoPhe-VSPPh (**23**); N-Pipu-Leu-homoPhe-VSC₁₀H₈ (**24**)

Todas as moléculas anteriormente descritas apresentam uma ou outra particularidade que as torna especiais para a química terapêutica. De facto, o seu estudo é uma fonte importante de informação para a síntese de novos inibidores, permitindo definir novas estratégias que vão de encontro a um objectivo comum: o de desenvolver um novo fármaco antimalárico, que actue ao nível das proteases de cisteína.

Nessa linha de trabalho, foi desenvolvido no ano anterior um estudo, no grupo de Química Farmacêutica e Terapêutica do iMed.UL, em que foram sintetizadas e testadas estruturas contendo um grupo diazo, no sentido de desenvolver inibidores de proteases de cisteína efectivos contra a malária.

1.4.1. Diazometano e 2-diazoacetato de etilo

A utilização de uma molécula contendo um grupo diazo para inibir proteases de cisteína, baseia-se no facto de um antibiótico natural, conhecido por azaserina (**25**), possuir a capacidade de inibir o crescimento celular da enzima amidotransferase que está envolvida na síntese de purinas, ao alquilar o grupo tiol do seu centro activo. Tal evidência, associada ao facto de que as diazometilcetonas utilizadas para a síntese de clorometilcetonas, não possuem actividade relativamente às proteases de serina, levou ao desenvolvimento de um inibidor, contendo a estrutura diazometilcetona: o Cbz-Phe-CH₂N₂ (**26**), que demonstrou ser um potente inibidor da papaína (200x mais potente que os seus congéneres halometilcetonas) (Figura 13).^{29, 31, 36}

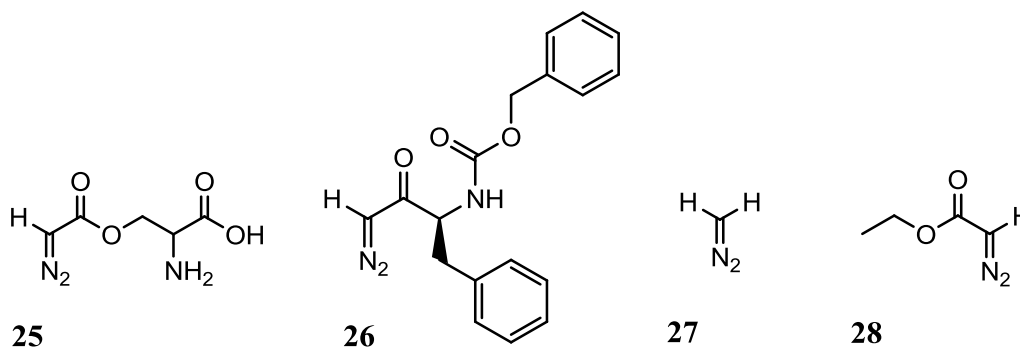
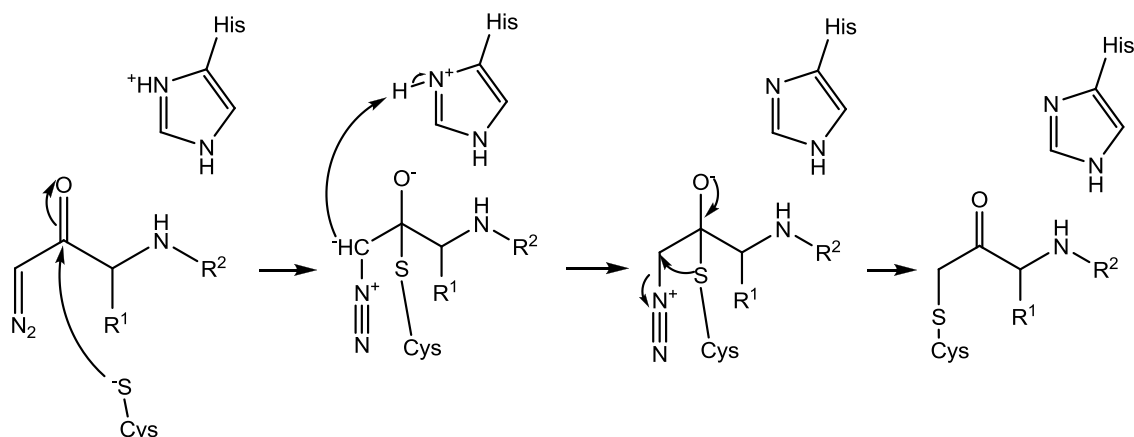


Figura 13- Moléculas contendo na sua estrutura o grupo diazo: Azaserina (**25**); Cbz-Phe-CH₂N₂ (**26**); Diazometano (**27**); 2-diazoacetato de etilo (**28**)

Este composto, bem como os seus análogos, também demonstraram possuir uma boa capacidade de penetração das membranas celulares e, apesar do seu mecanismo de acção ainda não ser claro, supõe-se que ocorre um ataque do tiolato do resíduo de cisteína (Cys) ao carbonilo da diazometilcetona, e a inevitável transferência de um protão da histidina (His) para o metileno, formando-se um intermediário tetraédrico. Posteriormente, ocorre a perda de azoto molecular, por rearranjo, originando-se um tioéter estável (Esquema 1).^{29, 31, 37}



Esquema 1- Mecanismo Inibitório proposto para as diazometilcetonas

Apesar da eficácia inibitória do diazometano (**27**) ser elevada, ao ponto de serem considerados os inibidores irreversíveis mais efectivos contra as proteases de cisteína, a sua instabilidade química pode originar metabolitos tóxicos para o ser vivo.^{29, 38} Tal facto, associado ao inconveniente de não estar disponível comercialmente, tem contribuído para a utilização de outra molécula, o 2-diazoacetato de etilo (EDA) (**28**), que por sua vez contém igualmente o grupo diazo, mas é menos reactivo.³⁷

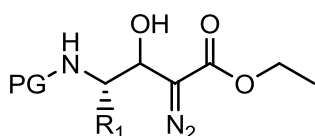
O EDA (**28**), possui um grupo carbonilo adjacente ao diazo que lhe confere uma maior estabilidade devido ao efeito de conjugação electrónica, determinando desta forma uma maior segurança na sua manipulação, sem a necessidade de trabalhar sob condições reaccionais específicas e de apertado controlo.³⁷ Por outro lado, com a maior estabilização do 2-diazoacetato de etilo (**28**) relativamente ao diazometano (**27**), é possível ter o EDA (**28**) comercialmente disponível.

Apesar do diazometano (**27**) e do EDA (**28**), representarem algum risco para a saúde humana, as diferenças relativas às suas propriedades fisiológicas também determinam que o **28** seja mais seguro, pois embora esteja listado como carcinogénico; o **27** está referenciado como carcinogénico, causador de edema pulmonar, asma, desordens no sistema nervoso, cardíaco, entre outros.^{37, 39}

Anteriormente, foi realizado um estudo no grupo de Química Farmacêutica e Terapêutica do iMed.UL, que visava o desenvolvimento de compostos diazo como inibidores de proteases de cisteína. Nesse trabalho foi testada a capacidade inibitória de moléculas que resultaram da adição aldólica entre o EDA (**28**) e *a*) um aldeído comercialmente disponível ou de *b*) um aldeído detentor de uma cadeia peptídica. Para além disso, também foi testada a reactividade entre α -diazo- β -hidroxiésteres (**29a-29k**) e α -diazo- β -cetoésteres (**30a-30k**) (Esquema 2).⁴⁰

Alfa-diazo-beta-hidroxiésteres

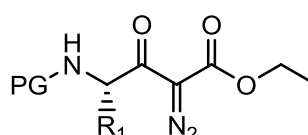
Aminoácidos



- 29a** PG=Cbz, R₁=CH₂C₆H₆
29b PG=Cbz, R₁=CH₃
29c PG=Cbz, R₁=CH(CH₃)₂
29d PG=Cbz, R₁=CH₂CH(CH₃)₂
29e PG=Boc, R₁=CH₂CH(CH₃)₂
29f PG=Boc, R₁=CH₂C₆H₆
29g PG=Boc, R₁=CH₂CH₂C₆H₆

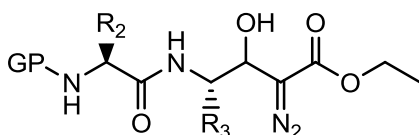
Alfa-diazo-beta-cetoésteres

Aminoácidos



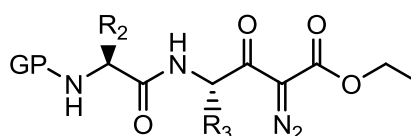
- 30a** PG=Cbz, R₁=CH₂C₆H₆
30b PG=Cbz, R₁=CH₃
30c PG=Cbz, R₁=CH(CH₃)₂
30d PG=Cbz, R₁=CH₂CH(CH₃)₂
30e PG=Boc, R₁=CH₂CH(CH₃)₂
30f PG=Boc, R₁=CH₂C₆H₆
30g PG=Boc, R₁=CH₂CH₂C₆H₆

Dipéptidos



- 29h** PG=Boc, R₁=CH₂C₆H₆, R₂=CH₂C₆H₆
29i PG=Boc, R₁=CH₂CH(CH₃)₂, R₂=CH₂C₆H₆
29j PG=Cbz, R₁=CH₂C₆H₆, R₂=CH₂C₆H₆
29k PG=Cbz, R₁=CH₂CH(CH₃)₂, R₂=CH₂C₆H₆

Dipéptidos



- 30h** PG=Boc, R₁=CH₂C₆H₆, R₂=CH₂C₆H₆
30i PG=Boc, R₁=CH₂CH(CH₃)₂, R₂=CH₂C₆H₆
30j PG=Cbz, R₁=CH₂C₆H₆, R₂=CH₂C₆H₆
30k PG=Cbz, R₁=CH₂CH(CH₃)₂, R₂=CH₂C₆H₆

Esquema 2 - α -diazo- β -hidroxiésteres (**29a-k**) e α -diazo- β -cetoésteres (**30a-k**) sintetizados anteriormente

Dos resultados apresentados, realizados através de ensaios fluorimétricos utilizando a papaína, concluiu-se que os compostos derivados dos aldeídos 3-fenilpropanaldeído (**31**), ciclohexanocarbaldeído (**32**) e octanal (**33**) não apresentaram qualquer actividade inibitória, ao contrário dos compostos que possuíam uma componente peptídica.⁴⁰ De acordo com os dados disponíveis,

os α -diazó- β -hidroxiésteres são mais efectivos na inibição da papaína relativamente aos α -diazó- β -cetoésteres, pois dos cinco compostos, cujo IC_{50} foi inferior a 100 μM (**29h-29k** e **30c**), quatro possuíam o grupo hidroxilo na posição β (Tabela 1).⁴⁰

Tabela 1- Valores de IC_{50} para a papaína, relativos aos compostos **29h-29k** e **30c**

Composto	Papaína IC_{50} (μM)	Composto	Papaína IC_{50} (μM)
29h	0,94 \pm 0,08	30c	52.40 \pm 3.45
29i	31,85 \pm 7,16	--	--
29j	3,51 \pm 0,46	--	--
29k	11,53 \pm 4,43	--	--

Tais resultados poderão estar relacionados com a menor capacidade de conjugação dos α -diazó- β -hidroxiésteres, devido à presença do grupo OH em detrimento do grupo cetona, aumentando assim a sua reactividade e activando, consequentemente a função diazo da estrutura. Para além disso, também foi referida a possibilidade do grupo hidroxilo facilitar a acomodação da molécula no centro activo da enzima durante o tempo suficiente e na conformação adequada para exercer a sua actividade inibitória, devido à sua eventual ligação a resíduos do centro activo por pontes de hidrogénio, facilitando o ataque da cisteína-25.⁴⁰

Recentemente, no grupo de Química Farmacêutica e Terapêutica do iMed.UL, foi igualmente publicado um trabalho em que foram avaliadas 3-metileno-indolin-2-onas, como agentes antimaláricos.⁴¹

1.4.2. 3-metileno-indolin-2-onas

As indolin-2-onas, também conhecidas por oxindóis, são compostos que estão presentes endogenamente nos mamíferos, especialmente em fluidos e tecidos, e são conhecidas por desempenhar funções importantes do ponto de vista biológico, como actividade inibitória da monoamina oxidase, actividade antibacteriana, antifúngica, anticonvulsante e antiviral.⁴² Têm, por isso, despertado interesse para o desenvolvimento de novos medicamentos, na área da química medicinal, indo desde o desenvolvimento de inibidores da transcriptase reversa do HIV (**34**) até à concepção de agentes antibacterianos (**37**) (Figura 14).^{43, 44}

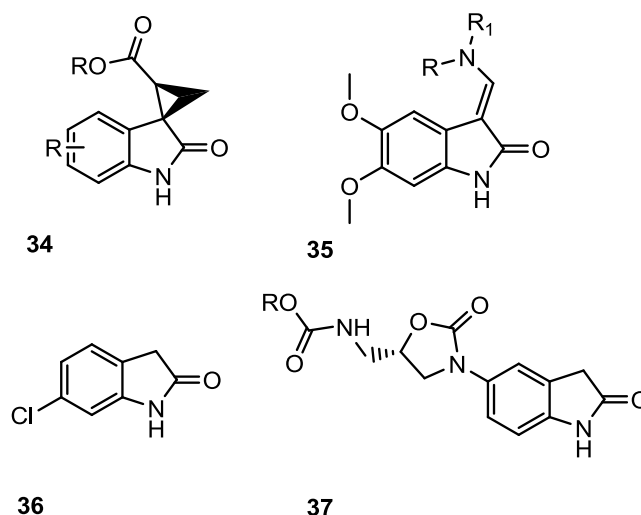


Figura 14- Exemplos de moléculas contendo o oxindole e que apresentam propriedades farmacológicas: Antiviral (**34**); Antihipertensor (**35**); Indutor de sono (**36**); Antibacteriano (**37**)

Outra das áreas em que a sua utilização tem sido muito importante, consiste na síntese de moléculas que possuam actividade inibitória relativamente às proteínas quinase, para que possam ser utilizadas quando o papel activo das proteínas quinase é suprimido por eventuais mutações ou por desregulação. Desse modo, é possível controlar os efeitos prejudiciais decorrentes do mau funcionamento dessas proteínas, como a alteração da sinalização celular, do ciclo celular, dos processos de diferenciação, transcrição genética, rearranjo do citoesqueleto, apoptose, movimento celular e controlo do metabolismo celular,

cujo desfecho pode originar no Homem diversas doenças como osteoporose, doença de Alzheimer, cancro, entre outras.⁴⁵

Tal como acontece no Homem, o parasita da malária também faz uso deste tipo de proteínas, utilizando as quinases que estão codificadas no seu genoma e também das proteínas do seu hospedeiro, de forma a assegurar a sua sobrevivência. Tal facto é de suma importância, pois as diferentes fases do seu crescimento possuem ciclos de crescimento celular complexos, que requerem a regulação destes moduladores. Esta dependência do parasita, relativamente ao bom funcionamento destas proteínas, levou à identificação e caracterização de algumas quinases do *P. falciparum* de forma a poder definir estratégias que pudessem alterar o seu ciclo, provocando assim a sua morte.

Foram, então, descritas algumas quinases presentes no *P. falciparum*, entre as quais o Pfmrk e o PfPK5, que tendo sido expostas a moléculas contendo o oxindole, foram inibidas comprometendo a sua sobrevivência (Figura 15).^{46, 47} Estes dados, são muito interessantes do ponto de vista terapêutico, pois poderão ser um prenúncio para a descoberta de um novo fármaco antimalárico, já que está provado que algumas etapas essenciais, como a invasão eritrocítica são comprometidas.⁴⁸

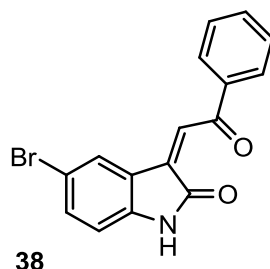
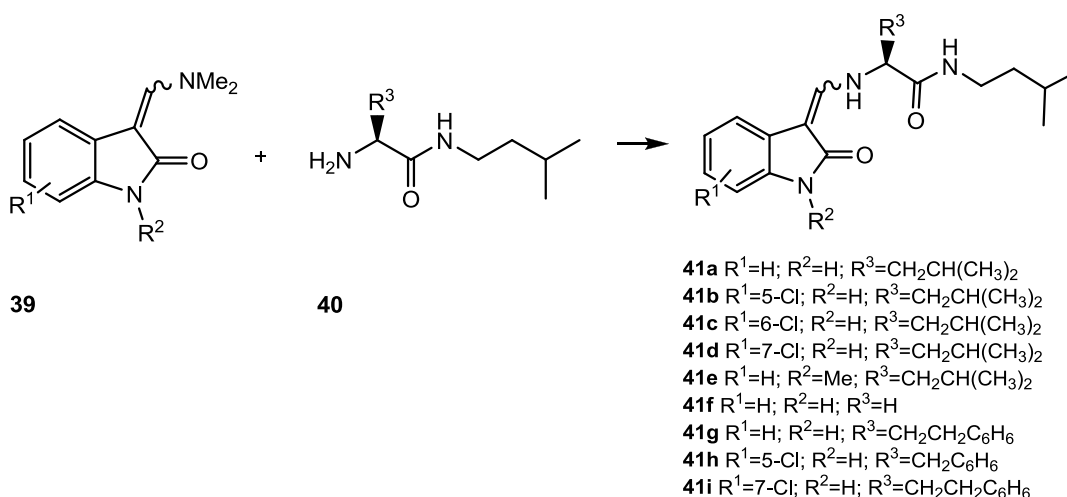


Figura 15- Inibidor da Pfmrk (**38**)

O sucesso destas moléculas, entretanto, serviu de inspiração para a síntese de estruturas oxindólicas, cujo alvo terapêutico fosse a inibição das proteases de cisteína. Esta abordagem ainda é muito recente, não estando ainda disponível uma biblioteca de compostos muito alargada. No entanto, um trabalho realizado pelo nosso grupo, publicado já este ano, apresentou resultados promissores.⁴¹

Nesse estudo desenvolveu-se uma biblioteca de 3-metileno-indolin-2-onas (**39**) e testou-se para a falcipaina 2 e para uma estirpe resistente à cloroquina (W2).⁴¹ O desenho destas moléculas foi pensado de forma a sintetizar estruturas com uma insaturação na posição alfa susceptível de sofrer uma adição nucleófila. Esta característica comum a todas as moléculas baseou-se na suposição de que, na presença das proteases de cisteína, as moléculas sintetizadas actuariam como aceitadores de Michael.⁴¹

De entre as moléculas sintetizadas destacaram-se 9 produtos finais (**41a-41i**), que tinham a particularidade de possuir uma estrutura de reconhecimento constituída por um aminoácido e uma isoamilamina (Esquema 3), tal como existe no inibidor de proteases de cisteína E64c.⁴¹



Esquema 3- Mecanismo geral da condensação da 3-metileno-indolin-2-ona substituída (**39**) com diferentes intermediários *N*-protegidos (**40**)

Estes compostos demonstraram possuir uma actividade inibitória moderada contra a falcipaina 2 e uma estirpe resistente à cloroquina W2 (Tabela 2).⁴¹

Tabela 2- Valores de IC₅₀ para a falcipaina 2 e para uma estirpe resistente à cloroquina (*P. falciparum* W2), relativos aos compostos **41a-38i** ⁴¹

Composto	Falcipaina 2 IC₅₀ (μM)	<i>P. falciparum</i> W2 IC₅₀ (μM)
41a	>50	30,7±1,7
41b	44,1±1,3	18,7±1,3
41c	48,5±2,0	15,9±0,5
41d	42,1±2,3	15,7±1,1
41e	>50	23,5±3,5
41f	>50	26,7±3,7
41g	49,9±0,3	18,6±0,4
41h	43,3±0,7	>50
41i	44,0±1,3	13,4±1,8

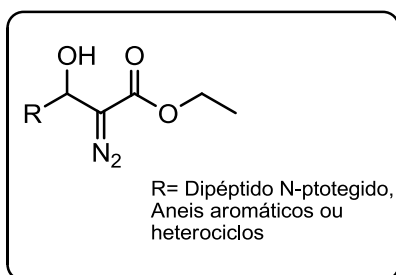
II. Discussão de resultados

O presente trabalho propôs-se a desenvolver duas bibliotecas distintas de compostos e testar a sua potencialidade enquanto antimaláricos (Esquema 4). Como tal, foram considerados dois trabalhos, que abordam a síntese de compostos inibidores de proteases de cisteína, contendo um grupo diazo e uma 3-metileno-indolin-2-ona, respectivamente (ver 1.4.1, pág. 19 e 1.4.2., pág. 23).^{40, 41}

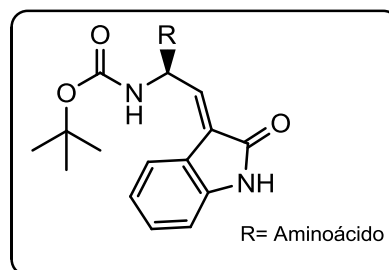
A primeira biblioteca de compostos é constituída por α -diazo- β -hidroxiésteres: Numa primeira fase foram sintetizados α -diazo- β -hidroxiésteres dipeptídicos. O processo de síntese consistiu no acoplamento dos aminoácidos, redução a aldeído e posterior inserção do grupo diazo, por adição aldólica. Em seguida, foram sintetizados α -diazo- β -hidroxiésteres contendo anéis aromáticos ou heterociclos. Nestas moléculas, o processo de síntese foi mais simples, consistindo na adição aldólica do diazo com aldeídos comercialmente disponíveis.

A segunda biblioteca de compostos é constituída por 3-metileno-indolin-2-onas contendo uma cadeia de reconhecimento (formada por um aminoácido). O processo de síntese consistiu na redução do aminoácido a aldeído e posterior inserção da indolin-2-ona, por condensação.

Alfa-diazo-Beta-hidroxiéster contendo dipéptidos, anéis aromáticos ou heterociclos



3-Metileno-indolin-2-ona contendo uma cadeia de reconhecimento



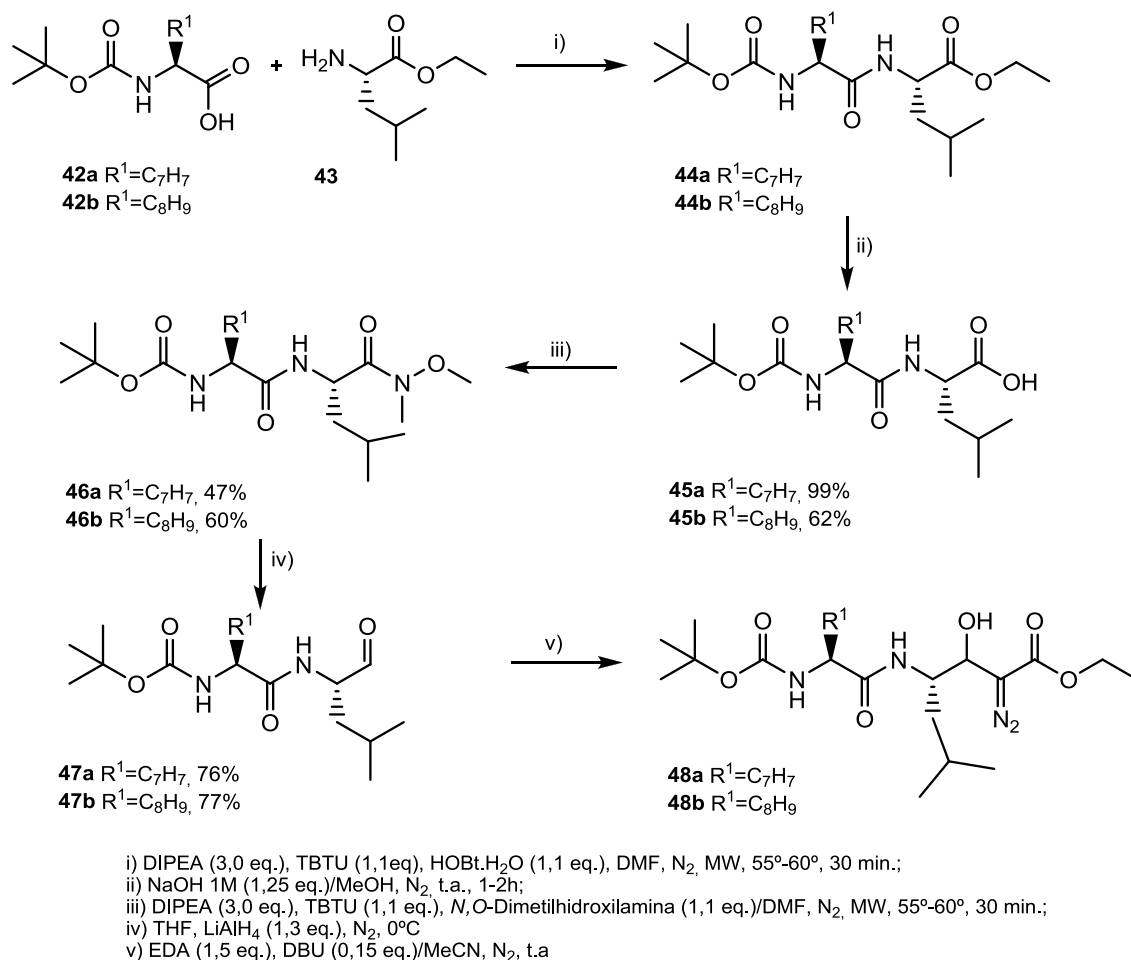
Esquema 4 - Apresentação dos compostos sintetizados no presente trabalho

2.1. Síntese de α -diazó- β -hidroxiésteres dipeptídicos

Considerando que os α -diazó- β -hidroxiésteres dipeptídicos são uma área promissora para o desenvolvimento de inibidores de proteases de cisteína, decidiu-se alargar a biblioteca de compostos sintetizada anteriormente, num trabalho do grupo de Química Farmacêutica e Terapêutica do iMed.UL.⁴⁰ Adicionalmente também foi definido que seria utilizada a papaína em detrimento da falcipaina para a realização dos ensaios biológicos, já que existe uma elevada homologia estrutural/funcional entre as proteases de cisteína do clã CA, e um profundo conhecimento da estrutura e do mecanismo catalítico da enzima papaína. Tal decisão foi tomada considerando que esta é uma enzima mais economicamente acessível, que permite numa primeira fase, definir qual a potencialidade dos inibidores contra as diferentes falcipainas.

Foram utilizados aminoácidos volumosos e com características hidrofóbicas, pois de acordo com a literatura disponível, estas são as estruturas de eleição da protease-alvo em estudo (papaína), havendo por isso uma grande afinidade por aminoácidos como a fenilalanina, a homofenilalanina e leucina.⁴⁹ Assim, em virtude desse conhecimento, determinou-se que se iria alargar a biblioteca de compostos dipéptidos utilizando os aminoácidos anteriormente citados, mas utilizando sequências diferentes das já sintetizadas, no sentido de observar o seu comportamento inibitório e tentar otimizar os resultados obtidos até à data: desenvolveram-se os dipéptidos Boc-Phe-Leu e Boc-HomoPhe-Leu.⁴⁰

O método utilizado para obter os compostos α -diazó- β -hidroxiésteres derivados de dipéptidos consistiu no acoplamento de dois aminoácidos e sua posterior conversão a aldeído, que por sua vez reagiu com o EDA (**28**), formando a estrutura pretendida (Esquema 5).

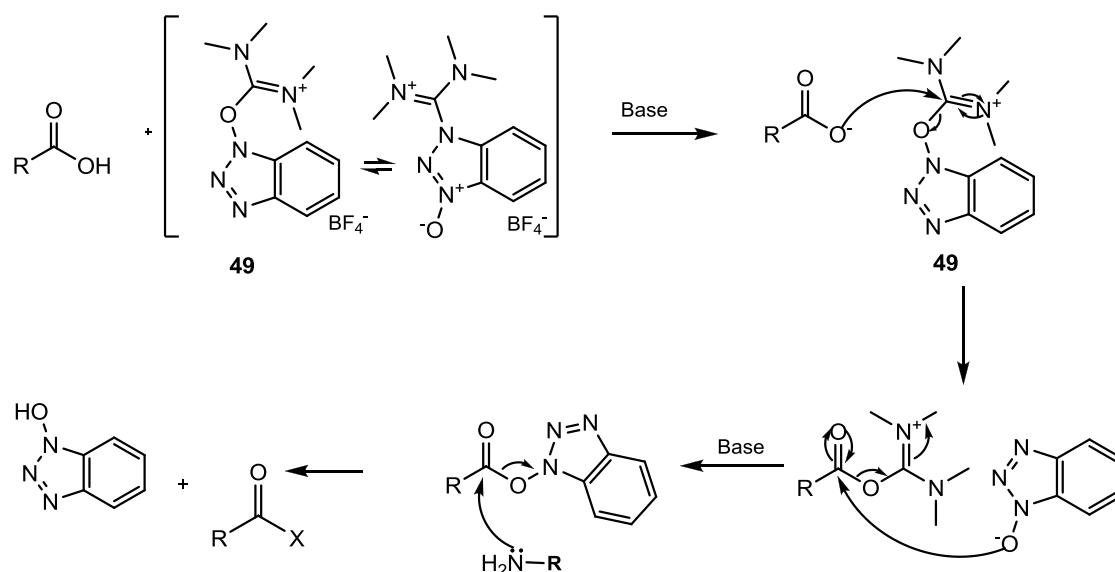


Esquema 5 - Esquema geral de síntese de α -diazo- β -hidroxiésteres dipeptídicos (**48a-b**)

2.1.1. Síntese de dipéptidos *N*-protegidos

O dipéptido foi sintetizado utilizando a metodologia desenvolvida por Santagada et al., em que se submete a mistura reaccional a condições de radiação e temperatura controlada através de microondas.⁵⁰ A utilização desta técnica possui a vantagem de diminuir drasticamente o tempo de reacção sem sacrificar os rendimentos. Tal facto, foi reforçado em estudos anteriores, por comparação deste método com outro que não utilizava microondas, não se tendo observado diferenças significativas de rendimento entre ambos os métodos.^{40, 50}

O procedimento consiste na adição sucessiva de TBTU (**49**) (1,1eq.), HOBT.H₂O (1,1eq.), do aminoácido C-protetido (1,1 eq.) e de DIPEA (3,0 eq.) a uma solução do aminoácido N-protetido (1,0eq.) em DMF anidro.⁵⁰ Nesta reacção estão presentes dois agentes acoplantes, o TBTU (**49**) e o HOBT.H₂O, que facilitam a formação da ligação peptídica entre os dois aminoácidos, activando a função carboxílica do primeiro aminoácido (aminoácido N-protetido) e funcionam como bons abandonantes durante o ataque nucleofílico da amina do segundo aminoácido (aminoácido C-protetido) (Esquema 6). A amina do primeiro aminoácido deve estar protegida, pois também é nucleofílica, sendo por isso, susceptível a promover reacções laterais. Neste trabalho, utilizou-se como grupo protector o *tert*-butoxicarbonilo (Boc), pois moléculas contendo este grupo demonstraram ser mais reactivas contra a papaína, que moléculas análogas contendo o grupo protector carboxibenzilo (Cbz). A função C-terminal do segundo aminoácido estava também protegida, com o intuito de proteger esse grupo de reacções laterais.^{50, 51}

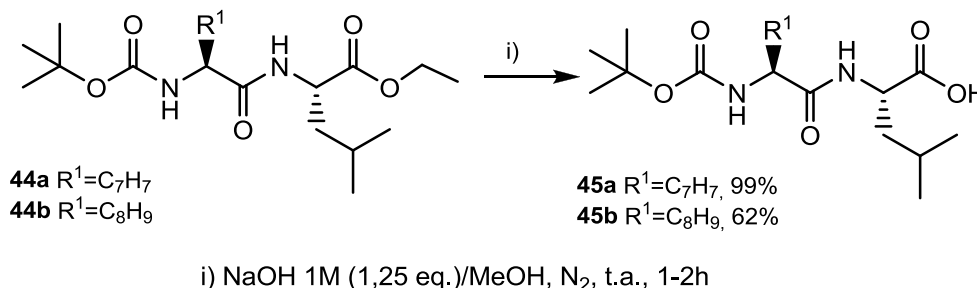


Esquema 6- Mecanismo de activação de ácidos carboxílicos utilizando TBTU (**49**)

A mistura reaccional foi então sujeita a um conjunto de condições reaccionais através de microondas, cuja programação consiste nos primeiros 15 minutos a

uma temperatura de 55°C e uma potência de 200W; e nos 15 minutos seguintes a uma temperatura de 60°C e a uma potência de 300W.⁵⁰

Uma vez finalizada a reacção de acoplamento foi realizada a desprotecção do C-terminal, de forma a continuar a síntese para as fases seguintes. Nesse sentido, para hidrolisar o éster, dissolveu-se o composto em metanol e adicionou-se NaOH 1M (1,25 eq.) à temperatura ambiente, mantendo as condições reaccionais até ao consumo total dos materiais de partida (Esquema 7).⁵² Não se purificou o dipéptido obtido, pois verificou-se que o grau de pureza destes compostos antes e depois de serem submetidos a processos de recristalização era muito idêntico, como comprovaram os espectros de ¹H-RMN.



Esquema 7- Esquema geral da hidrólise do éster (**44a-b**) utilizando NaOH

Os sinais característicos que possibilitaram a identificação dos dipéptidos após a hidrólise do éster, consistiram na presença de multipletos entre 7,35 e 7,13 ppm correspondentes ao grupo benzilo da fenilalanina e da homofenilalanina, um multipletos entre 1,74 e 1,46 ppm referente aos carbonos terciário e secundário da leucina e, finalmente a presença de um singletos a 1,43 ppm relativo ao grupo protector Boc.

O composto **45a** (Anexo A) cujo rendimento foi de 99%, apresentou no seu espectro de ¹H-RMN todos os sinais comuns a esta família de compostos e exibiu, simultaneamente, um dupletos a 3,07 ppm. Este sinal é relativo ao CH₂ benzílico que determina que o aminoácido em questão seja uma fenilalanina. Adicionalmente também foram observados os grupos NH a 5,08 e 6,43 ppm e os grupos CH a 4,38 e 4,55 ppm.

O composto **45b** (Anexo B) que apresentou um rendimento de 62%, possui relativamente ao composto **45a**, um CH₂ extra entre o grupo fenilo e a restante estrutura molecular. Como tal, apresentou dois multipletos entre 1,85 e 2,18 ppm e um singleto a 2,67 ppm, relativos a esses grupos metilenos, que determinam que o aminoácido inserido seja uma homofenilalanina. Os seus grupos NH apresentaram-se a 4,08 e 5,15 ppm, e os grupos CH, a 4,60 e 6,62 ppm.

O rendimento do composto **45b** foi menor relativamente ao **45a**, devido à hidrólise incompleta do seu éster.

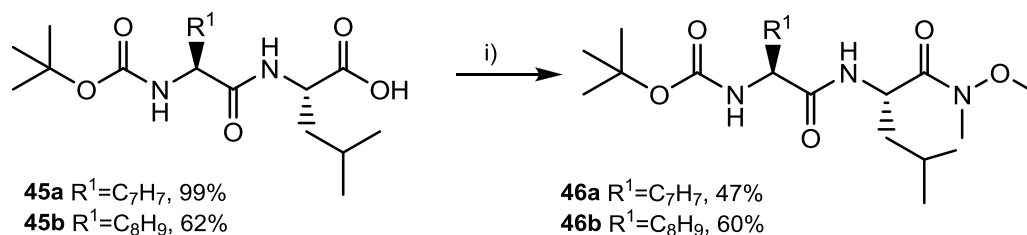
Em seguida, procedeu-se à formação de um intermediário contendo uma amida de Weinreb, pois este grupo é mais fácil de reduzir a aldeído que a função carboxílica do aminoácido.⁵³ Para além disso, a síntese de aldeídos a partir de amidas de Weinreb, minimiza o risco da redução prosseguir até à formação do álcool e permite obter conversões com rendimentos elevados.⁵⁴

2.1.2. Síntese de amidas de Weinreb dipeptídicas

A síntese da amida de Weinreb poderia ter sido conseguida através da metodologia tradicional desenvolvida por Steve Weinreb.⁵⁵ No entanto, utilizou-se um método alternativo que consistiu em também expor a mistura reaccional desta síntese a condições de temperatura e potência controladas por microondas (as condições reacionais são as mesmas referidas anteriormente).⁵⁰ Considerando que, tal como aconteceu na formação do dipéptido por microondas, o rendimento deste tipo de reacção foi similar ao do método convencional.⁴⁰

O método para formação de dipéptidos contendo uma amida de Weinreb, consiste na adição consecutiva de TBTU (1,1 eq.), N,O-dimetilhidroxilamina (1,1 eq.) e DIPEA (3,0 eq.) a uma solução de dipéptido *N*-protegido em DMF (Esquema 8).⁴⁰ Tal como foi referido na reacção de formação dos dipéptidos, a presença do TBTU (**49**), um agente acoplante, permite a activação da função

carboxílica ao aumentar o seu carácter electrofílico e assim facilitar o ataque da N,O-dimetilhidroxilamina, que irá culminar na formação da amida de Weinreb.⁵²



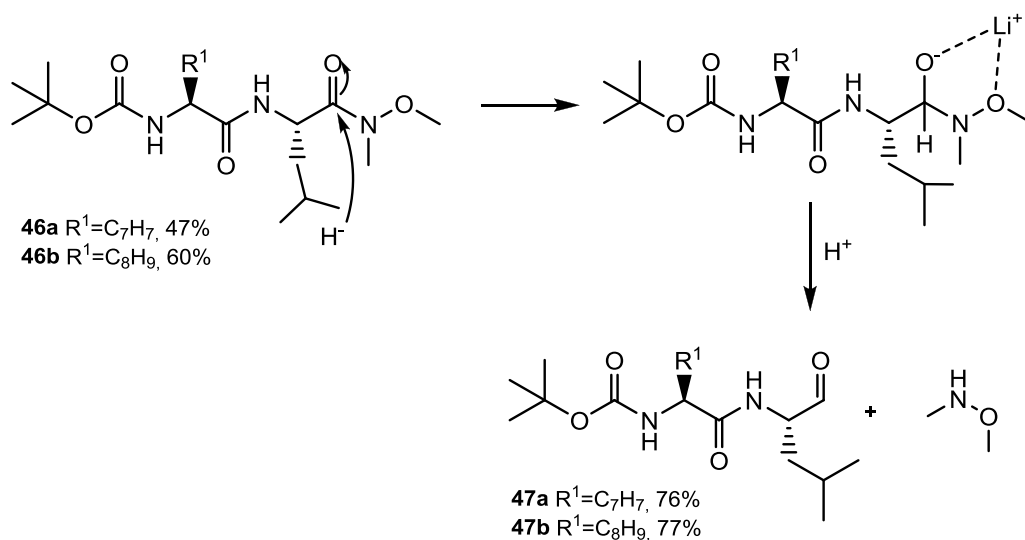
i) DIPEA (3.0 eq.), TBTU (1.1 eq.), N,O-Dimetilhidroxilamina (1.1 eq.)/DMF, N₂, MW, 55°-60°, 30 min.;

Esquema 8- Esquema geral da síntese de amidas de Weinreb (**46a-b**)

A formação de *N*-metoxi-*N*-metilamidas de dipéptidos foi conseguida com rendimentos satisfatórios, sendo que a confirmação da sua formação foi conseguida pela análise dos espectros de RMN (Anexo C e D). Os sinais característicos considerados para essa identificação consistiram na presença de 2 singletos, entre 3 e 4 ppm, que correspondem aos dois grupos metilos da amida de Weinreb. Os restantes sinais, para ambas as moléculas, partilham os valores já descritos em 2.1.1..

2.1.3. Síntese de aldeídos dipeptídicos

Para a síntese dos aldeídos adicionou-se LiAlH₄ (1,3 eq.) a uma solução da *N*-metoxi-*N*-metilamida em THF seco (Esquema 9).⁵⁴ Considerando que esta redução se faz na presença de um hidreto, a mistura reaccional deve manter-se a 0°C e sob atmosfera inerte de N₂ até estar concluída.⁵⁴



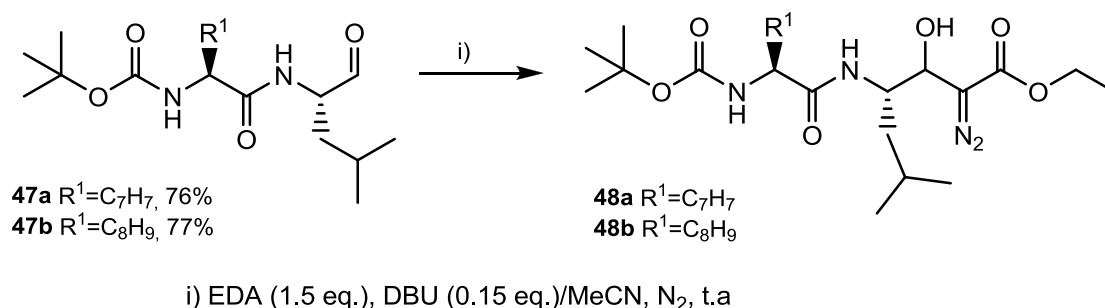
Esquema 9- Mecanismo de redução das amidas de Weinreb (**46a-b**)

De acordo com a literatura disponível, os aldeídos contendo dipéptidos para além de serem instáveis e serem susceptíveis de oxidação como todos os aldeídos, podem também sofrer epimerização quando estão em contacto com a sílica.⁵⁶ Tal facto, torna difícil a purificação destes compostos, pelo que não se procedeu ao seu isolamento, partindo para a última reacção desta síntese após a identificação de um sinal característico entre 9 e 10 ppm, no seu espectro de 1H -RMN, correspondente ao hidrogénio do aldeído. O rendimento do composto **47a** foi de 76% e o rendimento do **47b** foi de 77%.

2.1.4. Síntese de α -diazó- β -hidroxiésteres dipeptídicos

Uma vez sintetizados os aldeídos peptídicos, puderam-se sintetizar os produtos finais (Esquema 10). O procedimento escolhido foi desenvolvido por Jian et al., em que se utilizou DBU como base e acetonitrilo como solvente, já que o DBU é eficiente na desprotonação do EDA (**28**), podendo ser utilizado em quantidades catalíticas.⁵⁷

O procedimento consistiu na adição sucessiva de EDA (1,5 eq.) e de DBU (0,15 eq.) a uma solução do aldeído em MeCN, permanecendo à temperatura ambiente e sob atmosfera inerte de N₂ até estar concluída.⁵⁷



Esquema 10- Esquema geral da síntese de α -diazó- β -hidroxiésteres (**48a-b**)

A formação dos produtos finais foi confirmada por ¹H-RMN, com a identificação de sinais característicos, como a presença de um tripleto entre 1,29 ppm e 1,37 ppm, e de um quadrupeto entre 4,1 ppm e 4,5 ppm, correspondente ao CH₃ e CH₂ do grupo etóxi do EDA (**28**), respectivamente. Para além disso, o sinal relativo ao grupo protector Boc, também foi facilmente identificável, situando-se entre 1,30 ppm e 1,36ppm.

Infelizmente, após a purificação do produto, verificou-se que este apresentava sinais extra que indicavam presença de impurezas. Tal facto, poderá estar relacionado com a degradação do produto devido à elevada instabilidade destes compostos. Esta dificuldade em obter os produtos pretendidos no estado puro não permitiu testar a sua actividade inibitória, pois a presença de impurezas poderia alterar os resultados.

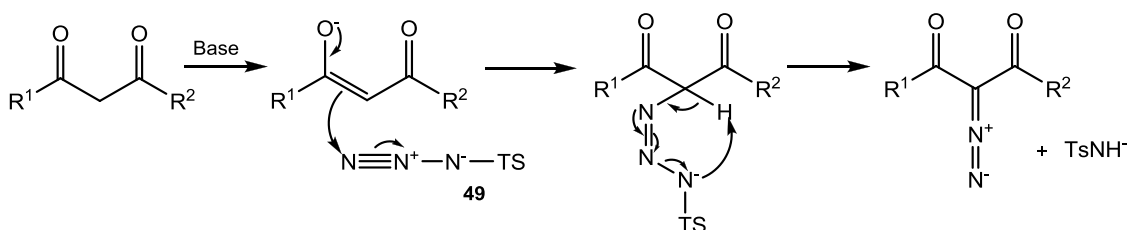
O desconhecimento sobre a capacidade inibitória dos produtos finais contendo dipéptidos, associado à sua elevada instabilidade, demonstrou que este poderia ser um caminho pouco viável na descoberta de um novo inibidor de proteases de cisteína. O futuro destas estruturas, poderá ser a inserção de uma estrutura diazo mais estável que o próprio 2-diazoacetato de etilo (**28**), de forma a aumentar a estabilidade do composto até que este encontre a enzima alvo, pois não basta que o inibidor seja activo contra a enzima pretendida: também tem que ser estável.

Assim, considerando a instabilidade dos compostos dipeptídicos obtidos, decidiu-se mudar o rumo deste trabalho de investigação, introduzindo o grupo diazo em anéis aromáticos e em heterociclos. Esta nova abordagem baseia-se na existência de fármacos antimaláricos que possuem este tipo de estruturas.

2.2. Síntese de α -diazó- β -hidroxiésteres contendo heterociclos e anéis aromáticos

Para a preparação dos compostos pretendidos foram consideradas duas vias sintéticas distintas, que possibilitam a introdução da função diazo na molécula pretendida: por transferência do grupo diazo para um carbaníon aceitador formado por desprotonação ou por reacção de um composto α -diazocarbonílico com um aldeído ou cloreto de ácido.^{39, 58}

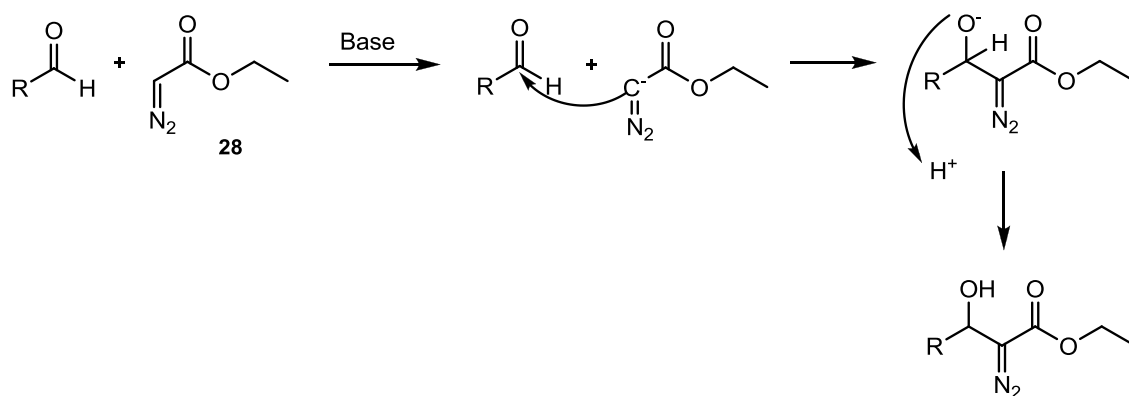
A transferência do grupo diazo ocorre através de sulfonilazidas, para as posições alfa metilénicas de derivados de cetonas ou de ésteres. Nesta reacção ocorre a remoção do protão α -carbonílico por uma base, formando-se o respectivo enolato que por sua vez irá reagir com o reagente de transferência, por exemplo, a tosilazida (Esquema 11) ou a mesilazida. Este método tem algumas desvantagens que estão associadas ao manuseamento de sulfonilazidas, como a decomposição térmica em espécies reactivas, designadas por sulfonilnitretos. A tosilazida (**49**), por exemplo, possui uma baixa temperatura de ignição e a sua decomposição é exotérmica, sendo um composto potencialmente explosivo. Por outro lado, para além desta limitação, também existe, em alguns casos, uma difícil separação do produto final. Outro aspecto, não menos importante corresponde à falta de regioselectividade para a posição alfa-metilénica, havendo mesmo uma predisposição para a sulfonilazida reagir preferencialmente com funções amida e amina dos derivados de cetona e ácido, caso existam, obrigando à sua protecção.^{39, 59}



Esquema 11 – Mecanismo de diazotização utilizando tosilazida (**49**)

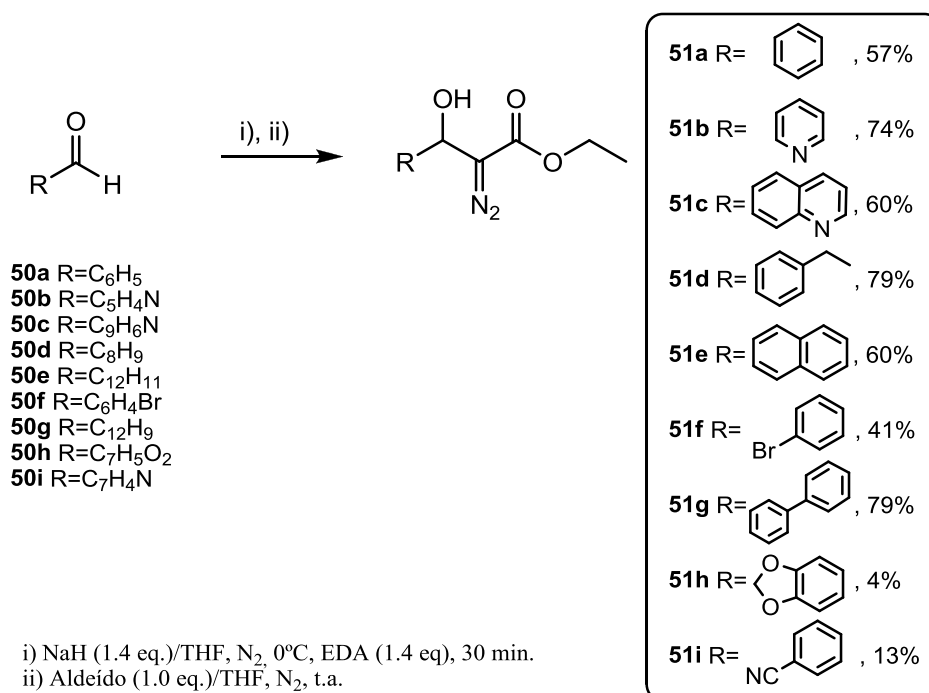
Na reacção de um composto alfa-diazocarbonílico com um aldeído ou um cloreto de ácido, existe a desprotonação do carbono alfa do 2-diazoacetato de etilo (**28**), através de uma base forte, para que posteriormente possa formar o composto pretendido, através de uma adição nucleófila, conhecida por adição aldólica. Esta reacção tem a vantagem de ser mais regiosselectiva relativamente à via anteriormente descrita e, por isso foi o método de eleição para a obtenção dos produtos pretendidos, utilizando aldeídos comercialmente disponíveis. Para além disso, esta estratégia demonstrou ser bastante efectiva noutro trabalho, cujo objectivo era partilhado com o da presente tese: desenvolver inibidores de proteases de cisteína com potencial antimalárico.^{30, 40}

O NaH foi a base utilizada para desprotonar o 2-diazoacetato de etilo (**28**) (Esquema 12), porque demonstrou ser mais eficaz relativamente a outras bases fortes, como o LDA e o *n*-BuLi, na produção do produto pretendido.⁴⁰ Assim sendo, considerando a reactividade do hidreto utilizado, foi necessário manter a reacção a 0°C e utilizar um solvente seco. O procedimento consistiu na adição lenta de EDA (1,4 eq.) a uma suspensão de NaH (1,2 eq.) em THF seco a 0°C, mantendo a mistura reaccional a essa temperatura durante 30 minutos. Posteriormente, deixou-se atingir a temperatura ambiente nos 30 minutos seguintes, para adicionar o aldeído em seguida. Finalmente, mantiveram-se as condições descritas até ao desaparecimento do material de partida.^{37, 40, 60}



Esquema 12- Mecanismo da adição aldólica que ocorre entre aldeídos e EDA (**28**)

O delineamento dos diazo a sintetizar foi elaborado considerando que a terapêutica antimalárica actualmente utilizada baseia-se em estruturas contendo heterociclos quinolínicos - como a aminoquinolina - cuja estrutura possui elevada simplicidade molecular, estabilidade química e baixo custo de desenvolvimento.⁶¹ Para além disso, a síntese de compostos não peptídicos, não possui algumas das desvantagens existentes em compostos com sequências peptídicas, nomeadamente a baixa biodisponibilidade oral devido à sua actividade proteolítica e a baixa permeabilidade intestinal provocada pela sua elevada massa molecular e hidrofilicidade.⁶² Assim, definiu-se que seriam sintetizadas moléculas utilizando os aldeídos benzaldeído (**50a**), nicotinaldeído (**50b**), quinolino-4-carboxialdeído (**50c**), 3-fenilpropanal (**40d**), 3-(naftalen-2-il)propanal (**50e**), 4-bromobenzaldeído (**50f**), bifenil-4-carbaldeído (**50g**), benzo[d][1,3]dioxole-5-carbaldeído (**50h**), 4-formilbenzonitrilo (**50i**); a partir dos quais se formaram os respectivos α -diazo- β -hidroxiésteres, de acordo com o método descrito (Esquema 13).



Esquema 13- Esquema geral da síntese de α -diazo- β -hidroxiésteres (**51a-i**), a partir de aldeídos comercialmente disponíveis (**50a-i**).

Os α -diazó- β -hidroxiésteres sintetizados foram obtidos com rendimentos satisfatórios na sua generalidade, à excepção dos compostos **51h-51j**, sendo que a sua identificação se baseou em métodos de espectroscopia de ressonância magnética (RMN) de protão, através da identificação de sinais característicos a estes compostos, como a presença de um tripleto entre 1,29 e 1,37 ppm, e de um quadrupletto entre 4,1 e 4,5 ppm, correspondendo respectivamente ao CH₃ e CH₂ do grupo etóxi. Já no espectro de ¹³C-RMN, foi possível confirmar a formação do produto final, através da observação de um sinal entre 14 e 15 ppm, relativo ao carbono CH₃, dois sinais entre 60 ppm e 70 ppm, relativos ao carbono CH₂ e ao carbono β (CHOH). Paralelamente, também se realizaram análises de espectroscopia de infravermelho, com o objectivo de identificar a existência do grupo diazo, cuja absorvância característica corresponde à região de 2100 cm⁻¹. Realizaram-se ainda análises de espectrometria de massa, com o intuito de confirmar a massa molecular dos compostos.

O produto final **51a** (Anexo E) cujo rendimento foi de 57%, apresentou no espectro de ¹H-RMN um multipletto situado entre 7,50 e 7,29 ppm, que corresponde ao grupo fenilo que está integrado na sua estrutura. Para além disso, acusou a presença do protão ligado ao carbono β , através de um singletto a 5,92 ppm e do grupo hidroxilo, a 2,93 ppm também sob a forma de singletto. No seu espectro de ¹³C-RMN, para além dos sinais comuns a esta biblioteca de compostos, identificaram-se todos os sinais do grupo fenilo: os 5 carbonos terciários a 128,77 ppm (C-3 e C-5), 128,33 ppm (C-4) 125,73 ppm (C-2 e C-6), bem como o carbono quaternário a 138,87 ppm (C-1).

O composto **51b** (Anexo F) foi obtido com um rendimento de 74%, e difere do **51a** pela presença de uma piridina em substituição ao grupo fenilo. No espectro de ¹H-RMN estão presentes os singletos 1,67 e 5,96 ppm, referentes ao grupo hidroxilo e ao protão ligado ao carbono β , respectivamente. Aparece um duplo dupletto a 7,35 ppm para o H-5, um dupletto a 7,80 e 8,58 ppm referente a H-4 e H-6 e um singletto em 8,70 ppm referente ao H-2. No espectro de ¹³C-RMN, identificaram-se os sinais dos carbonos da piridina. São eles os carbonos terciários C-5 (123,69 ppm), C-4 (133,97 ppm), C-6 (147,39 ppm) e C-2 (149,11

ppm) e o carbono quaternário C-3, cujo sinal é partilhado com o C-5, a 123,69 ppm.

O composto **51c** (Anexo G), foi obtido com um rendimento de 60% e apresenta na sua estrutura um anel quinolínico. O espectro de ^1H -RMN, exibiu várias alterações relativamente ao composto **51b**, no que se refere às posições dos seus sinais. Assim sendo, apresentou o próton ligado ao carbono β sob a forma de singlete a 6,55 ppm e os prótons da quinolina entre 7,50 e 8,89 ppm, onde o H-6 e o H-7, representados como tripletos estão a 7,50 e a 7,65 ppm, respectivamente, e o H-4 está a 7,72 ppm, como singlete. Os prótons H-5 e H-8, aparecem como dupletos a 7,84 e 8,08 ppm. Finalmente o H-2 estando mais desblindado aparece a 8,89 ppm na forma de singlete. No espectro de ^{13}C -RMN foram identificados todos os sinais esperados, nomeadamente os que representam a quinolina: os carbonos terciários C-6 (117,74 ppm), C-5 (122,75 ppm), C-8 (124,86 ppm), C-7 (127,42 ppm), C-4 (130,09 ppm) e C-2 (150,15 ppm); e os carbonos quaternários C-4a (127,42 ppm), C-3 (129,44 ppm) e C-8a (147,86 ppm).

O composto **51d** (Anexo H), que foi obtido com um rendimento de 79%, é idêntico ao composto **51a**, com a diferença que possui uma cadeia etileno entre o carbono β e o grupo fenilo. O espectro de ^1H -RMN deste composto para além de ter apresentado um multipletos entre 7,27 e 7,09 ppm, que corresponde ao grupo fenilo, também exibiu multipletos entre 1,79 e 2,04 ppm e entre 2,60 e 2,62 ppm, relativos aos prótons presentes na cadeia etílica ligada ao grupo fenilo. O espectro de ^{13}C -RMN para além de apresentar os sinais do grupo fenilo de forma muito idêntica a **51a**: carbonos terciários a 128,54 ppm (C-3 e C-5), 128,46 ppm (C-2 e C-6) e 126,17 ppm (C-4) e carbono quaternário a 140,89 ppm; também apresentou dois sinais a 31,90 e 35,07 ppm, que correspondem à cadeia etílica ligada ao grupo fenilo.

O composto **51e** (Anexo I) foi sintetizado com um rendimento de 60%. O espectro de ^1H -RMN apresenta um singlete a 7,95 ppm que corresponde ao próton H-1 do naftaleno e dois multipletos entre 7,54-7,43 ppm e 7,91-7,80 ppm. Observa ainda um singlete a 6,09 ppm e outro a 3,34 ppm, correspondentes ao próton ligado ao carbono β e ao grupo hidroxilo,

respectivamente. No espectro de ^{13}C -RMN foi possível identificar todos os sinais referentes ao naftaleno: os carbonos terciários C-8 (123,59 ppm), C-4 (124,71 ppm), C-5 (126,34 ppm), C-2 (126,45 ppm), C-6 (127,75 ppm), C-7 (128,20 ppm) e C-3 (128,72 ppm); e os carbonos quaternários C-6a (133,16 ppm), C-2a (133,23 ppm) e C-1 (136,21 ppm).

O composto **51f** (Anexo J) foi obtido com um rendimento de 41%, e apresenta na sua estrutura um grupo fenilo com um átomo de bromo ligado à posição 4. O espectro de ^1H -RMN apresenta um singlete a 3,25 ppm e outro a 5,79 ppm, correspondentes ao grupo hidroxilo e ao próton ligado ao carbono β . Para além disso também exhibe multipletos entre 7,29 e 7,13 ppm, relativos aos prótons H-2 e H-6 e entre 7,49 e 7,37 ppm, relativos aos prótons H-3 e H-5. O espectro de ^{13}C -RMN para além dos sinais comuns a todos os compostos apresenta dois sinais a 128,61 e 131,90 ppm para os carbonos terciários (C-2 e C-6; C-3 e C-5), do grupo fenilo. Adicionalmente também se observa o sinal do carbono quaternário ligado ao átomo de bromo a 122,24 ppm e o do carbono quaternário C-1 a 137,90 ppm.

O composto **51g** (Anexo K) apresentou um rendimento de 79%, e possui um grupo bifenilo. No espectro de ^1H -RMN para além dos sinais do grupo hidroxilo e do próton ligado ao carbono β , situados a 3,04 e 5,96 ppm, respectivamente, observa-se também a presença de um multiplete entre 6,95 e 6,76 ppm, referente ao grupo bifenilo. No espectro de ^{13}C -RMN é possível identificar todos os seus carbonos quaternários, nomeadamente o C-4 (146,08 ppm), C-1' (146,50 ppm), C-1 (146,99 ppm) e o grupo carbonilo (165,35 ppm). Adicionalmente também são observados os carbonos terciários do grupo bifenilo a 100,00 ppm (C-6'), 100,21 ppm (C-2'), 105,35 ppm (C-4'), 107,20 ppm (C-3), 107,37 ppm (C-5), 118,22 ppm (C-3'), 119,50 ppm (C-5'), 131,59 ppm (C-2) e 133,82 ppm (C-6). Finalmente os sinais relativos aos carbonos da cadeia etóxi e ao carbono β , aparecem a 13,46, 60,22 e 67,55 ppm.

O composto **51h** (Anexo L) apresentou um rendimento de 4%, e possui na sua estrutura um benzo[d][1,3]dioxiol. O espectro de ^1H -RMN apresenta os sinais referentes ao grupo hidroxilo e ao próton ligado ao carbono β a 3,11 e 5,96 ppm, respectivamente. Adicionalmente observam-se os sinais referentes ao

benzo[*d*][1,3]dioxiol, entre 7,35 e 7,61 ppm, onde os prótons H-5 e H-6 são exibidos sob a forma de tripletos a 7,35 e 7,45 ppm, respectivamente. Os prótons na posição 3' (H-3'a e H-3'b) situaram-se a 7,50 ppm sob a forma de duplete e o próton H-2 entre 7,56 e 7,61 ppm sob a forma de tripleto. No espectro ^{13}C -RMN é possível identificar todos os carbonos referentes ao benzo[*d*][1,3]dioxiol, onde os carbonos terciários C-5, C-2 e C-6, se situam a 127,12, 127,51 e 128,84 ppm, respectivamente. O carbono secundário C-3' aparece a 126,22 ppm e os carbonos quaternários C-1, C-4 e C-3 aparecem a 137,80, 140,51 e 141,24 ppm, respectivamente.

O composto **51i** (Anexo M) apresentou um rendimento de 13%, e diferencia-se do **51a** pela presença de um nitrilo na posição 4. O espectro de ^1H -RMN para além dos sinais comuns aos restantes compostos apresenta um duplete a 7,56 ppm, correspondente aos prótons H-2 e H-6, e outro a 7,67 ppm, relativo aos prótons H-3 e H-5. O próton ligado ao carbono β , aparece sob a forma de singlete a 5,92 ppm. No espectro ^{13}C -RMN são igualmente observados os carbonos que correspondem ao grupo benzonitrilo, nomeadamente os carbonos quaternários a 110,98 ppm (C-4), 117,50 ppm (CN) e 143,53 ppm (C-1) e os carbonos terciários a 125,54 ppm (C-2 e C-6) e a 131,56 ppm (C-3 e C-5).

Adicionalmente também foi sintetizada uma molécula diazo utilizando um grupo ferroceno (**51j**). Esta abordagem surgiu do conhecimento de que actualmente está a ser desenvolvido pela Sanofis-Aventis R&D, um fármaco denominado ferroquina (SR97193) (**52**), que se baseia na substituição de dois metilenos da cadeia lateral da cloroquina (**2**) por uma unidade de ferrocenilo (Figura 16) e que tem apresentado uma actividade antimalárica promissora, tendo sido mais efectivo que a cloroquina (**2**) em estirpes resistentes do *P. falciparum* e em linhagens que ainda são sensíveis.⁶³⁻⁶⁶ Além disso, a ferroquina (**52**) que também possui a vantagem de ser sintetizada de forma relativamente simples e barata, encontra-se desde 2007, em ensaios clínicos de fase II, em associação com o artesunato de sódio (**9b**).^{66, 67}

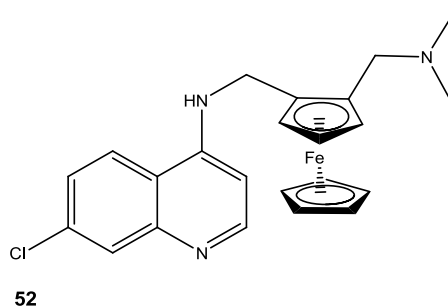


Figura 16- Fármaco antimalárico que está a ser desenvolvido: Ferroquina (SR97193) (**52**)

O composto **51j** (Anexo N), que, foi obtido com um rendimento de 13%, possui a estrutura mais diferenciada dos compostos **51a-i**, por integrar um ferroceno e não apenas pequenas alterações pontuais. No espectro de ^1H -RMN os prótons presentes no ferroceno apresentam-se sob a forma de multiplete entre 4,17 e 4,32 ppm. Já o grupo hidroxilo e o próton ligado ao carbono β , estão de acordo com o deslocamento dos sinais observados para os restantes produtos (**51a-i**): 2,86 e 5,50 ppm, respectivamente. O espectro de ^{13}C -RMN apresenta vários sinais entre 25,61 e 88,67 ppm, que são derivados do ferroceno, exceptuando o sinal a 61,02 e 65,27 ppm, que representam o carbono do CH_2 do grupo etóxi e o carbono β .

Os compostos **51h**, **51i** e **51j**, tal como foi referido anteriormente, apresentaram um rendimento muito reduzido contrariamente ao que seria desejável. Estes valores ocorreram devido à reacção não ser completa, ainda que os seus tempos de reacção tenham sido superiores ao dos restantes compostos (46, 48 e 30h, respectivamente).

2.2.1. Actividade inibitória do α -diazó- β -hidroxiésteres contendo heterociclos e anéis aromáticos

Tendo-se sintetizado todos os compostos pretendidos (**51a-51j**), procedeu-se finalmente à determinação da sua capacidade inibitória, face à papaína, que possui uma elevada homologia estrutural e funcional com a falcipaina.

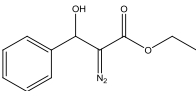
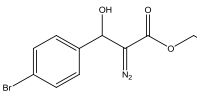
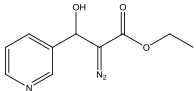
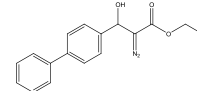
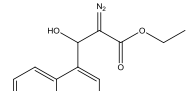
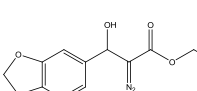
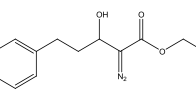
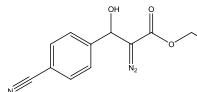
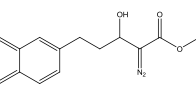
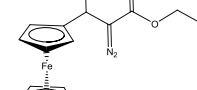
Os ensaios de inibição da actividade da enzima papaína foram efectuados com a colaboração da Dr.^a Lídia Gonçalves, que avaliou todas as amostras de acordo com um método descrito na literatura.⁶⁸ O método baseia-se na medição da fluorescência emitida pelo produto da hidrólise do substrato fluorogénico resultante da acção da papaína. A razão entre a fluorescência na ausência e na presença de várias concentrações de inibidor permite através de uma curva dose-resposta determinar o IC₅₀ para cada composto (os ensaios foram realizados em triplicado e o controlo positivo foi o E64 (**18**)).⁶⁸

De acordo com os resultados obtidos, a actividade inibitória dos α -diazó- β -hidroxiésteres **51a-i** não foram activos contra a papaína, para as concentrações utilizadas (Tabela 3). Tal facto, não significa que a biblioteca sintetizada não tenha potencial antimalárico, pois poderá ser activa contra o *P. falciparum*, como acontece com vários antimaláricos, cuja estrutura também integra heterociclos e anéis aromáticos. Assim sendo, é da maior importância conhecer a actividade dos compostos **51a-i** relativamente ao *P. falciparum*, no sentido de definir a sua potencialidade enquanto tal. Adicionalmente devem ainda ser realizados ensaios biológicos direccionados especificamente para a falcipaina.

O composto **51j** apresentou actividade para a papaína. Este é um resultado interessante, pois de acordo com a literatura disponível, o ferroceno isolado não possui qualquer actividade contra a malária, mas quando é integrado numa estrutura de reconhecido valor antimalárico pode constituir um candidato promissor para o desenvolvimento de um novo fármaco por aumentar o seu potencial terapêutico, como é o caso da ferroquina (**52**).⁶⁹ O papel do ferroceno ainda não é claro que aumente o potencial antimalárico, no entanto, uma das hipóteses que é avançada, baseia-se na inibição da formação do cristal de hemozoína. O facto destas estruturas poderem possuir um carácter inibitório da hemozoína poderá estar associada a vários factores, entre os quais a inibição

das proteases de cisteína, pois estas enzimas proteolíticas estão envolvidas em processos de degradação da hemoglobina (precursor da hemozoína), necessária à maturação dos trofozoítos a esquizonte. Para além disso, o grupo ferroceno é muito volumoso e tem demonstrado conferir lipofilicidade às moléculas por ele integradas, o que vai de encontro à preferência das proteases-alvo, que apresentam predilecção por aminoácidos volumosos e hidrofóbicos.^{4, 49, 66} Outra alternativa que se poderá colocar, relaciona-se com o facto da molécula **51j** possuir uma acção ambivalente possuindo simultaneamente actividade inibitória da protease de cisteína, conferida pela presença do grupo diazo e, uma outra acção antimalárica, conferida pelo ferroceno, que poderá estar relacionada com um outro processo fisiológico do parasita, como a geração de espécies reactivas de oxigénio capazes de desencadear um processo de peroxidação lipídica.⁶⁶

Tabela 3- Valores de IC₅₀ para a papaína relativos às moléculas obtidas pela adição do EDA (**28**) aos aldeídos

Composto	Desig.	IC ₅₀ (μM)	Composto	Desig.	IC ₅₀ (μM)
	51a	>100		51f	>100
	51b	>100		51g	>100
	51c	>100		51h	>100
	51d	>100		51i	>100
	51e	>100		51j	48±10

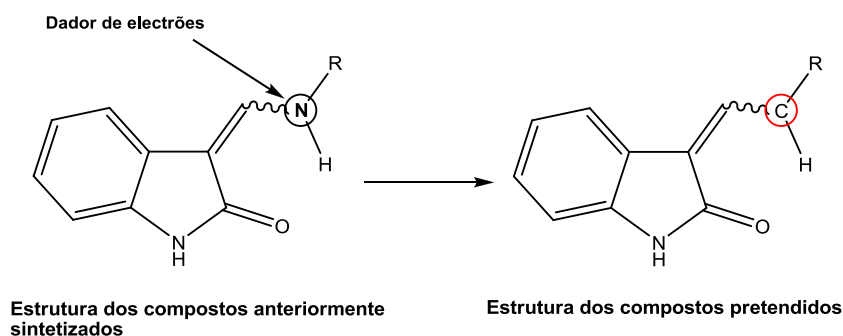
Apesar da molécula **51j** apresentar alguma actividade inibitória contra a papaína seria importante testar o seu poder inibidor relativamente às proteases de cisteína do *P. falciparum*, pois só dessa forma é possível compreender o seu papel na procura de novos candidatos antimaláricos. Para além disso, seria interessante tentar integrar uma cadeia peptídica, de forma a observar o comportamento da molécula.

2.3. Síntese de 3-metileno-indolin-2-onas

Numa terceira fase do trabalho, decidiu-se sintetizar compostos utilizando 3-metileno-indolin-2-onas. A mudança da estrutura base das moléculas, baseou-se na recente publicação de um trabalho desenvolvido no grupo de Química Farmacêutica e Terapêutica do iMed.UL, no qual se sintetizaram derivados de 3-metileno-indolin-2-onas (**41**) e se testaram como antimaláricos (Esquema 3, pág. 25).⁴¹

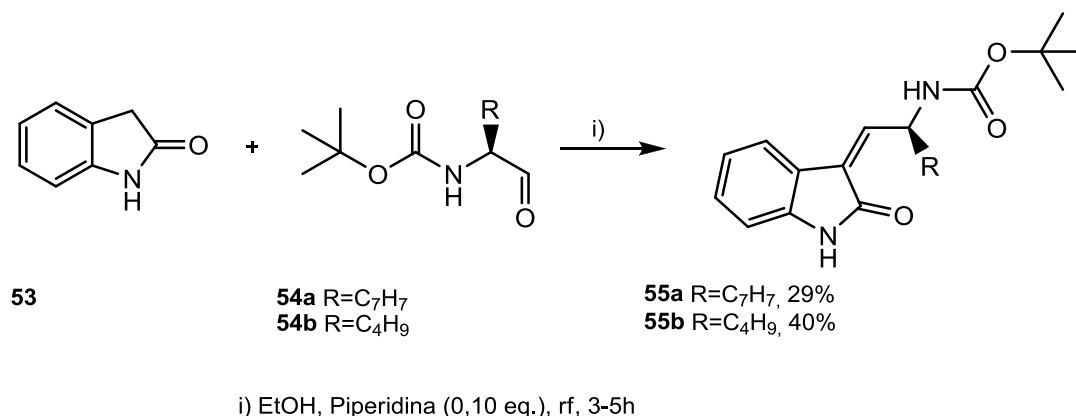
Os compostos sintetizados anteriormente demonstraram possuir na sua generalidade uma capacidade inibitória na ordem dos 45 μM . No entanto, algumas características estruturais poderão ter diminuído a mesma, por não contribuírem para a estabilização da ligação com a protease de cisteína.⁴¹ A capacidade do átomo de azoto ceder electrões à ligação pode provocar a diminuição da electrofilia do carbono reactivo, tornando-o menos apto a sofrer o ataque do tiolato da cisteína, impedindo ou retardando a adição de Michael.

Assim sendo, decidiu-se no presente trabalho, desenhar moléculas cuja estrutura de reconhecimento não possuísse um átomo de azoto ligado directamente ao carbono reactivo, de forma a tentar otimizar o potencial inibitório das moléculas, enquanto aceitadores de Michael (Esquema 14).



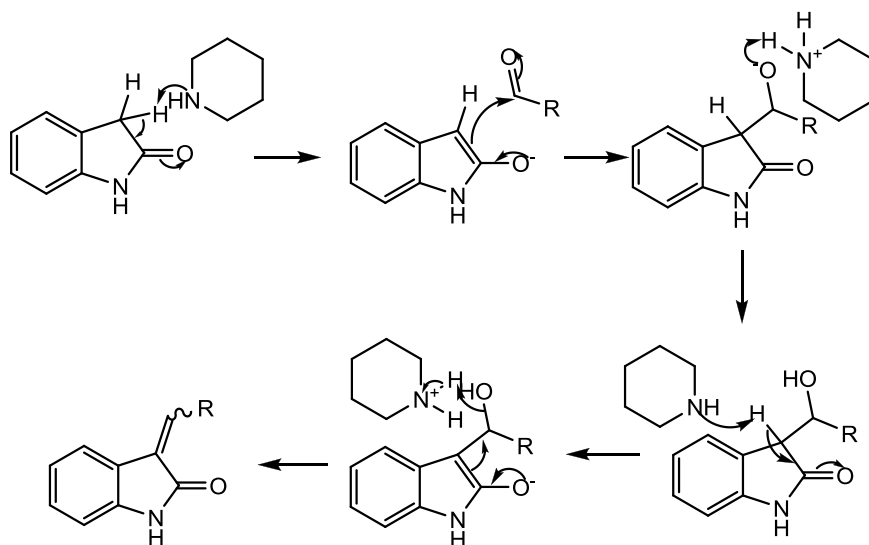
Esquema 14 – Desenho de novas estruturas 3-metileno-indolin-2-onas, considerando estruturas anteriormente sintetizadas

Nesse sentido, procedeu-se à condensação aldólica da indolin-2-ona (1,0 eq.) com um aldeído contendo um aminoácido *N*-protegido (1,2 eq.), em etanol, a refluxo e na presença de piperidina (0,10 eq.), até ao consumo total dos materiais de partida (Esquema 15).⁷⁰



Esquema 15- Esquema geral da condensação aldólica da indolin-2-ona (**53**) com o aldeído

Nesta reacção, também conhecida por reacção de Knoevenagel (Esquema 16), ocorre a remoção de um H⁺ pela piperidina, gerando-se um enolato, que por sua vez irá reagir com o carbonilo do aldeído. Em seguida, ocorre a remoção de um segundo protão pela amina, provocando a formação de um novo enolato que, por desidratação, origina o composto final pretendido.



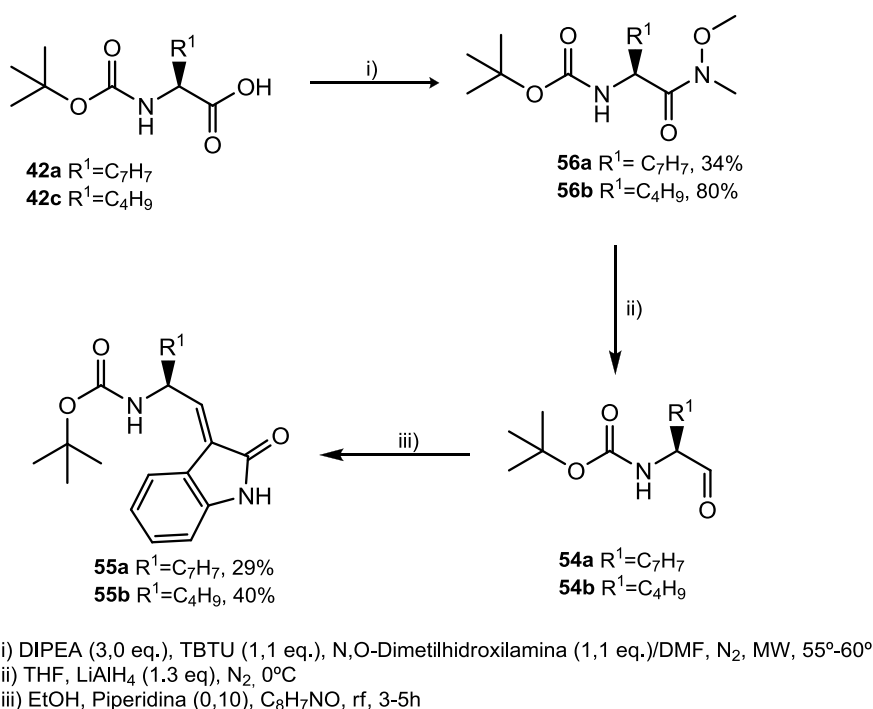
Esquema 16- Mecanismo proposto para a síntese de 3-metileno-indolin-2-onas

A síntese do aldeído contendo o aminoácido *N*-protegido foi obtida de acordo com a metodologia descrita anteriormente, em que o aminoácido *N*-protegido foi convertido a uma amida de Weinreb (ver 2.1.2., pág.37) e em seguida reduzido a aldeído (ver 2.1.3., pág. 38).

A estratégia adoptada para a escolha dos aminoácidos a utilizar obedeceu aos mesmos critérios utilizados para a escolha da construção das cadeias de

reconhecimento dos α -diazó- β -hidroxiésteres: a preferência da papaína por aminoácidos volumosos e hidrofóbicos. Assim sendo, os aminoácidos usados foram a Boc-Phe e a Boc-Leu.

Na formação das amidas Weinreb (**56a-c**), observou-se especificamente a presença de dois singletos relativos aos dois grupos metilo da amida, entre 3,16 e 3,78 ppm. Por sua vez, o sinal característico que permitiu confirmar a formação do aldeído (**54a-c**), consistiu na identificação de um singlete entre 9 e 10 ppm, relativo ao próton de hidrogênio do aldeído (Esquema 17).



Esquema 17 – Esquema geral de síntese de 3-metileno-indolin-2-onas (**55a-b**)

Finalmente obtiveram-se as moléculas finais **55a-b**, cuja identificação se baseou inicialmente, na análise dos espectros de ¹H-RMN, através da identificação de sinais característicos a estes compostos. Entre eles está a presença de um grupo protector Boc a cerca de 1,49 ppm, bem como a presença de multipletos entre 7,00 e 7,30 ppm que correspondem aos prótons aromáticos da indolin-2-ona.

O composto **55a** (Anexo O) cujo rendimento foi de 29%, apresenta um espectro de ^1H -RMN em que foi observado um duplete a 3,55 ppm e que corresponde ao CH_2 benzílico. São igualmente identificados os prótons dos grupos NH, sob a forma de singletos a 11,91 e 11,16 ppm, bem como o próton ligado ao carbono β a 6,89 ppm. Os prótons do grupo fenilo aparecem entre 7,35 e 7,26 ppm como multipletos e os prótons presentes na estrutura oxindólica exibem os seus sinais a 5,87 ppm (H-7), 7,42 ppm (H-5), 7,51 ppm (H-6) e 8,41 ppm (H-4). No espectro de ^{13}C -RMN é possível identificar todos os sinais referentes aos carbonos da sua estrutura, nomeadamente os seus carbonos quaternários a 81,67 ppm ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 142,72 ppm (C-3a), 151,56 ppm (C-1^{Ph}), 154,73 ppm (C-7a), 160,42 ppm (C=O) e 194,36 (C-2). Os seus carbonos terciários relativos à estrutura oxindólica C-4, C-5, C-6 e C-7 são exibidos a 120,61, 133,64, 129,14 e 102,12 ppm, respectivamente. Já os carbonos terciários do grupo fenilo, são observados a 126,93 (C-4^{Ph}), 127,22 (C-6^{Ph}), 128,65 (C-2^{Ph}), 129,29 (C-5^{Ph}) e 129,65 ppm (C-3^{Ph}). O sinal do carbono ligado ao grupo NH ($\text{C}_8\text{H}_5\text{NOCH}$) aparece a 39,43 ppm, o carbono benzílico a 45,08 ppm e, finalmente, o carbono β a 120,43 ppm.

O composto **55b** (Anexo P) apresentou um rendimento de 40%, e difere do composto **55a**, pela presença do aminoácido leucina. Este produto apresenta uma mistura de diastereoisómeros, que não foi possível separar. Tal facto determinou a presença de sinais desdobrados e com multiplicidades inesperadas em ambos os espectros de RMN (^1H e ^{13}C), tendo dificultado a sua análise e consequentemente, a atribuição dos sinais. Ainda assim, no espectro de ^1H -RMN aparece um multiplete entre 1,06 e 0,97 ppm, relativo aos prótons ligados aos dois carbonos primários da leucina e um singlete a 2,38 ppm correspondente ao próton ligado ao carbono terciário desse aminoácido. Entre 2,66 e 2,51 ppm aparece um multiplete que representa simultaneamente os dois prótons ligados ao carbono secundário da leucina e o próton ligado ao carbono adjacente ao grupo NH (posição γ). Por sua vez, o próton ligado ao carbono β é exibido sob a forma de multiplete entre 6,92 e 6,82 ppm e os sinais são identificados entre 6,92 e 8,50 ppm. O espectro de ^{13}C -RMN apresenta a 22,61 e 23,17 ppm os dois carbonos primários da leucina; a 25,31 e 25,16 ppm o carbono terciário da leucina e a 28,25 e 28,37 ppm os carbonos primários do

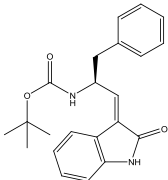
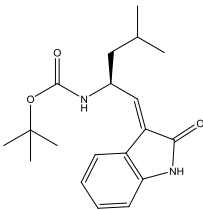
grupo protector Boc. Adicionalmente aparecem ainda os sinais para o carbono ligado ao grupo NH da estrutura na posição γ , a 38,36 ppm, o carbono secundário da leucina a 53,91 ppm e todos os sinais do oxindole entre 201,10 e 109,44 ppm. O carbono quaternário C=O, é identificado a 170,18 e 168,88 ppm e o carbono β entre 123,71 e 121,58 ppm.

O rendimento de ambos os produtos (**55a** e **55b**), não foi muito elevado, já que o seu rendimento não ultrapassou os 40%. Este valor poderá ser explicado pelo facto de no passo anterior (redução a aldeído), não ter sido realizada a purificação do aldeído.

2.3.1. Actividade Inibitória dos derivados de 3-metileno-indolin-2-onas

Os compostos sintetizados demonstraram possuir actividade inibitória, entre os quais se destaca o **55a**, com o valor de 82 μM (Tabela 4). Tal facto poderá estar associado à preferência da papaína por aminoácidos volumosos, já que o aminoácido fenilalanina (**55a**) é mais volumoso que o aminoácido leucina (**55b**).⁴⁹

Tabela 4- Valores de IC_{50} para a papaína relativos às moléculas obtidas (**55a-b**) pela condensação aldólica dos aldeídos derivados de aminoácidos com indolin-2-ona

Composto	Desig.	IC_{50} (μM)	Composto	Desig.	IC_{50} (μM)
	55a	82 \pm 3		55b	252 \pm 52

De acordo com resultados obtidos anteriormente, o composto **41a** possui uma actividade de 88 μM contra a papaína (dado não publicado). Esta estrutura difere do **55b**, pela presença de uma isoamilamina e de um átomo de azoto ligado ao carbono reactivo. Ao contrário do que era esperado, o composto **55b**, cuja actividade foi de 252 μM , não demonstrou ser um inibidor mais potente que **41a**, por não possuir um átomo de azoto junto ao carbono reactivo. Tal facto poderá estar relacionado com a ausência da isoamilamina, já que esta estrutura parece ser indispensável para a actividade do inibidor E64c. Assim, seria do maior interesse introduzir uma isoamilamina no composto **55b**, de forma a observar a sua inibição e poder concluir se a presença de um átomo electrodador junto ao carbono reactivo influencia verdadeiramente a actividade do composto, como aceitador de Michael.

Se a isoamilamina potenciar a actividade destes compostos, poder-se-á estar na presença de uma nova família de inibidores com grande potencialidade no desenvolvimento de antimaláricos livres de resistências. Isto porque, de acordo

com os resultados obtidos, os compostos **41a-i**, apresentaram uma actividade inibitória muito superior, quando testados contra uma estirpe resistente do *P. falciparum* (W2) (dados não publicados).

Ainda assim, seria indispensável conhecer a actividade dos compostos **55a-b**, relativamente à falcipaina e ao *P. falciparum*, de forma a definir a potencialidade das estruturas sintetizadas, como antimaláricos.

2.4. Conclusão e perspectivas futuras

O estudo apresentado teve como objectivo o desenvolvimento de potenciais inibidores de proteases de cisteína, especificamente direccionados para as proteases do *P. falciparum*: as falcipainas. Nesse sentido, foram sintetizadas duas bibliotecas de novos compostos, os α -diazó- β -hidroxiésteres e as 3-metileno-indolin-2-onas, cuja actividade foi testada para a papaína (enzima que possui elevada homologia funcional/estrutural com a falcipaina).

Os α -diazó- β -hidroxiésteres foram sintetizados com sucesso, tendo-se obtido doze compostos não descritos na literatura, dos quais dois possuíam uma cadeia dipeptídica (**47a-b**), nove possuíam anéis aromáticos ou heterociclos (**51a-i**) e um continha um grupo ferroceno (**51j**).

Os compostos **47a** e **47b** foram obtidos com um rendimento de 76 e 81%, respectivamente. Através da análise dos seus espectros de RMN, concluiu-se que ambas as moléculas apresentavam algumas impurezas. Tal facto, poderá estar relacionado com a sua instabilidade, pelo que não foram sujeitos a ensaios biológicos.

Os compostos **51a-i** foram obtidos com rendimentos compreendidos entre 41 a 79%, à excepção do **51h** e do **51i**, que apresentaram rendimentos de 4 e 13%, respectivamente. Nas concentrações utilizadas, nenhum deles apresentou actividade contra a papaína, muito embora integrassem na sua estrutura anéis aromáticos ou heterociclos, à semelhança de alguns fármacos antimaláricos. No entanto, apesar da inibição dos compostos **51a-i** não ser expressiva relativamente à enzima utilizada, é possível que sejam activos contra o *P. falciparum*, como ocorre com várias moléculas de valor reconhecido. Seria por isso, da maior importância, proceder a ensaios biológicos mais específicos, cujo alvo fosse o parasita.

O composto **51j**, foi obtido com um rendimento de 13%, e integra na sua estrutura um grupo ferroceno. Este composto apresentou uma actividade de 48 μ M, demonstrando que a optimização desta estrutura poderá vir a desempenhar um papel importante no desenvolvimento de novos antimaláricos. Tal facto, vai de encontro ao que está descrito na literatura, em

que é referido o potencial de estruturas contendo um grupo de ferroceno no desenho de compostos para o tratamento da malária. Considerando que o composto é activo contra a papaína é indispensável realizar ensaios biológicos utilizando a falcipaina e o *P. falciparum*.

As 3-metileno-indolin-2-onas também foram sintetizadas com êxito, tendo-se obtido dois compostos, o **55a** e o **55b**, cujas estruturas integram uma fenilalanina e uma leucina, respectivamente.

O composto **55a**, foi obtido com um rendimento de 29%, e apresentou a actividade mais promissora das 3-metileno-indolin-2-onas, com um IC₅₀ de 82 µM. O facto de a sua actividade ter sido a mais efectiva do grupo poderá estar relacionado com a preferência da papaína por aminoácidos volumosos.⁴⁹ Como tal, novos ensaios deverão ser realizados, utilizando a falcipaina e o *P. falciparum*, no sentido de observar a sua actividade.

O composto **55b** foi obtido com um rendimento de 40%, apresentando uma actividade de 252 µM. Esta inibição foi inferior à registada para o composto **41a** - 88 µM (dado não publicado) - cuja estrutura diferia pela presença de uma isoamilamina e de um átomo de azoto junto ao carbono reactivo.⁴¹ Considerando que o desenho do composto **55b** foi realizado para eliminar o átomo de azoto, optimizando a molécula enquanto aceitadora de Michael, seria de esperar que a sua actividade fosse superior a **41a**. Esta poderá estar relacionada com a ausência da isoamilamina, pelo que seria interessante proceder à sua inserção no composto **55b**. Adicionalmente, também devem ser realizados os ensaios biológicos específicos para a malária, utilizando a falcipaina e o *P. falciparum*.

A realização deste trabalho permitiu desenvolver e testar um conjunto de novos compostos, como inibidores de proteases de cisteína. Apesar de ainda não terem sido realizados testes mais específicos para as proteases de cisteína presentes no parasita da malária, dois compostos demonstraram ser potenciais candidatos para o desenvolvimento de um novo antimalárico, nomeadamente o **51j** e o **55a**. Seria, por isso, interessante introduzir alterações pontuais nesses compostos, no sentido de tentar melhorar a sua actividade:

No composto **51j** poder-se-ia inserir uma cadeia de reconhecimento, peptídica ou peptidomimética, no sentido de permitir/optimizar o reconhecimento da enzima.

No composto **55a** poder-se-ia introduzir um átomo de cloro na indolin-2-ona, pois de acordo com a literatura disponível, a presença desse halogéneo beneficia a actividade de alguns compostos similares.⁴¹ Além disso, também seria interessante introduzir uma isoamilamina à estrutura, tal como foi proposto para o composto **55b**.

III. Procedimento experimental

3.1. Preâmbulo

A execução do trabalho experimental envolveu alguns procedimentos gerais que serão seguidamente apresentados:

- Os solventes foram purificados e secos de acordo com métodos adaptados aos descritos na literatura:⁷¹
- Os reagentes foram adquiridos comercialmente e utilizados sem prévia purificação (grau de pureza > 97%);
- Cromatografia em camada fina (CCF). A utilização das CCF foi útil no seguimento da evolução das reacções. Para esse efeito usaram-se folhas de alumínio com sílica gel F₂₅₄ (Merck®). A revelação dos cromatogramas foi possível por irradiação de luz ultravioleta (UV) a 254 nm e 366 nm. Aquando a sua utilização, os eluentes foram indicados, assim como a sua proporção volumétrica;
- Cromatografia em coluna. A cromatografia em coluna foi útil no isolamento e purificação dos compostos sintetizados. Para esse efeito utilizaram-se colunas de tamanho variável, cujo enchimento foi realizado por sílica Kieselgel 60 GF254 (Merck®), de granulometria de 40-63 µm. Aquando a sua utilização, os eluentes foram indicados, assim como a sua proporção volumétrica;
- Cromatografia preparativa em camada fina. A cromatografia em coluna foi útil no isolamento e purificação de alguns dos compostos sintetizados. Utilizaram-se placas de vidro com sílica Kieselgel 60 GF254 (Merck®), com 1.5 mm de espessura. A revelação dos cromatogramas foi possível por irradiação de luz ultravioleta (UV) a 254 nm e 366 nm. Aquando a sua utilização, os eluentes foram indicados, assim como a sua proporção volumétrica;

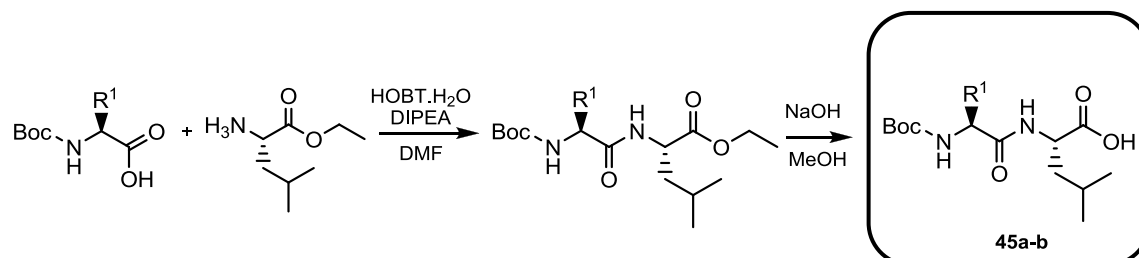
- Espectrometria de infravermelhos (IV). Os espectros de IV foram conseguidos por meio da utilização de um aparelho Impact 400, Nicolet Instrument Corporation. São apresentadas apenas as frequências correspondentes às bandas características do grupo carbonilo e do grupo diazo. Os dados obtidos são apresentados da seguinte forma: NaCl (em pastilha de cloreto de sódio): frequência máxima de absorção ($\nu_{\text{máx}}$ em cm^{-1}); tipo de banda (f- forte ou l- larga); atribuição do grupo de átomos da molécula em análise;

- Espectrometria de Massa (MS). Os espectros de massa de baixa resolução foram conseguidos através da utilização de um espectrómetro de massa triplo quadrupólo, realizados no laboratório de Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massa da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Os dados obtidos são apresentados da seguinte forma: razão massa/carga (m/z); atribuição do ião ou fragmento molecular, intensidade do pico relativamente ao pico base (%);

- Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os espectros de RMN foram conseguidos através de um espectrómetro Bruker AMX-400 (400Hz), na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Os desvios são apresentados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) são expressas em Hertz (Hz). Como padrão interno utilizou-se o sinal residual do solvente deuterado, sobre o qual se conhece o respectivo desvio químico face ao tetrametilsilano (TMS). Os dados obtidos são apresentados da seguinte forma: Núcleo (solvente); desvio químico (δ , ppm): (multiplicidade do sinal (s - singleto; d - duplete; t - tripleto; q - quadruplete; m - multiplete), constante de acoplamento (J), atribuição na molécula, intensidade relativa]. A atribuição das estruturas foi possível pela análise de espectros ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY e HMQC.

3.2. Síntese de α -diazo- β -hidroxiésteres dipeptídicos

3.2.1. Síntese de dipéptidos *N*-protegidos



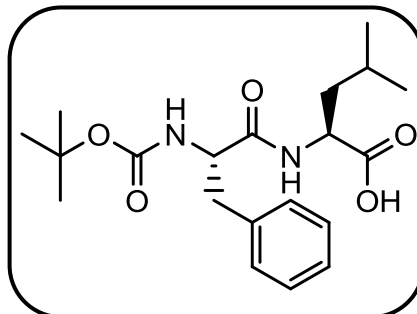
Método Geral: Um tubo fechado de microondas, contendo o aminoácido *N*-protegido (1 mmol; 1,0 eq.), TBTU (1,1 mmol; 1,1 eq.), HOBT.H₂O (1,1mmol; 1,1 eq.), o aminoácido C-terminal protegido (1,1mmol; 1,1 eq.) e DIPEA (3,0 mmol; 3,0 eq.) em DMF (4 mL), foi submetido a radiação por microondas, nas condições operacionais de 55°C a 200W, nos primeiros 16 minutos e de 60°C a 300W, nos 16 minutos seguintes.

Em seguida, adicionou-se água destilada (10 mL) e extraiu-se 3x com acetato de etilo (20 mL). Posteriormente lavou-se 3x a fase orgânica com ácido cítrico 5% (20 mL), 3x com NaHCO₃ 5% (20 mL) e 3x com a solução saturada de NaCl (20 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e após filtração e lavagem com acetato de etilo, o solvente foi evaporado a pressão reduzida.

Posteriormente, procedeu-se à hidrólise do éster, adicionando NaOH 1M (1,25 mmol; 1,25 eq.) ao resíduo obtido previamente dissolvido em metanol. Deixou-se reagir à temperatura ambiente até ao consumo total do material de partida. Finalmente, adicionou-se uma solução de HCl 1M (1,1 mmol; 1,25 eq.) e água destilada (5 mL), tendo-se extraído com DCM. A fase orgânica foi, então, seca com Na₂SO₄ anidro e após filtração, o solvente foi evaporado a pressão reduzida.

3.2.1.1. Síntese de Ácido (S)-2-((S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-fenilpropanamido)-4-metilpentanóico (45a)

Obteve-se um sólido branco, após 1,5 h de hidrólise. O seu rendimento foi de 99% (373 mg), não se tendo procedido a métodos adicionais de purificação.

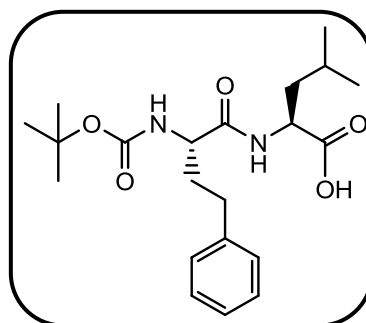


Este composto apresentou a seguinte análise espectroscópica:

$^1\text{H-RMN}$ δ (400MHz, CDCl_3): 7.35-7.14 (m, ArH , 5H), 6.43 (s, NHCH , 1H), 5.08 (s, NHCH , 1H), 4.55 (s, NHCH , 1H), 4.38 (s, NHCH , 1H), 3.07 (d, $J = 8,0$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, 2H), 1.72-1.46 (m, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2 + \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, 3H), 1.40 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, 9H), 0.91 (d, $J = 8,0$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, 6H) ppm

3.2.1.2. Síntese de Ácido (S)-2-((S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-fenilbutanamido)-4-metilpentanóico (45b)

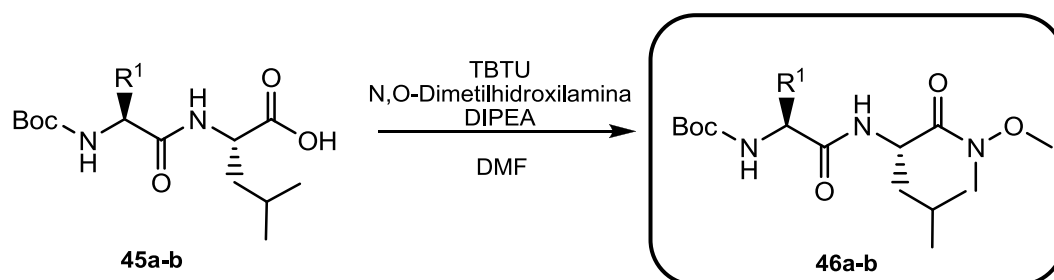
Obteve-se um sólido branco, após 2 h de hidrólise. O seu rendimento foi de 62% (240 mg), não se tendo procedido a métodos adicionais de purificação.



Este composto apresentou a seguinte análise espectroscópica:

$^1\text{H-RMN}$ δ (400MHz, CDCl_3): 7.31-7.13 (m, ArH , 5H), 6.62 (s, NHCH , 1H), 5.15 (s, NHCH , 1H), 4.60 (s, NHCH , 1H), 4.17-4.04 (m, NHCH , 1H), 2.67 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, 2H), 2.18-2.07 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, 1H), 1.97-1.85 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, 1H), 1.74-1.54 (m, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2 + \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, 3H), 1.43 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, 9H), 0.93 (s, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, 6H) ppm

3.2.2. Síntese de Amidas de Weinreb dipeptídicas

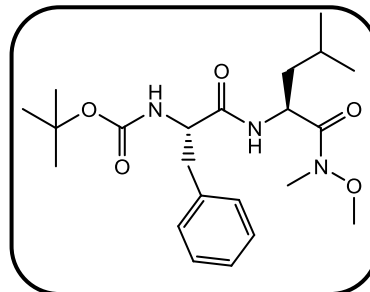


Método Geral: Um tubo fechado de microondas, contendo o dipéptido *N*-protegido (1,0 mmol; 1,0 eq.), TBTU (1,1 mmol; 1,1 eq.), N,O-Dimetilhidroxilamina (1,1 mmol; 1,1 eq.) e DIPEA (3,0 mmol; 3,0 eq.) em DMF (5 mL), foi submetido a radiação por microondas, nas condições operacionais de 55°C a 200W, nos primeiros 16 minutos e de 60°C a 300W, nos 16 minutos seguintes.

Em seguida, adicionou-se diclorometano (15 mL) e lavou-se 3x a fase orgânica com água destilada (20 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e após filtração, o solvente foi evaporado a pressão reduzida.

3.2.2.1. Síntese de *N*-metil-*N*-metóxi-(*S*)-2-((*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-fenilbutanamido)-4-metilpentanamida (46a)

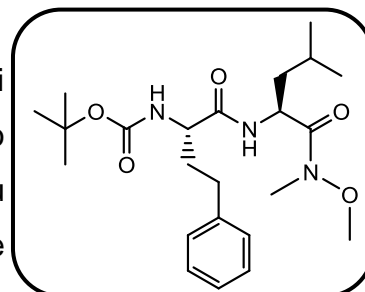
Obteve-se um óleo amarelo cuja purificação foi realizada por coluna flash usando *n*-hexano e acetato de etilo, na proporção de 3:2. O composto apresentou um rendimento de 47% (195 mg) e a seguinte análise espectroscópica:



¹H-RMN δ (400MHz, CDCl₃): 7,33- 7,14 (m, ArH, 5H), 6,45-6,21 (m, NHCH, 1H), 5,05-4,90 (m, NHCH+ NHCH, 2H), 4,38 (s, NHCH, 1H), 3,79 (s, OCH₃, 3H), 3,18 (s, NCH₃, 3H), 3,07 (d, $J = 8$ Hz, CH₂C₆H₅, 2H), 1,48-1,41 (m, CH₂CH(CH₃)₂, 2H), 1,41 (s, C(CH₃)₃, 9H), 1,37-1,30 (m, CH₂CH(CH₃)₂, 1H), 0,96-0,84 (m, CH₂CH(CH₃)₂, 6H) ppm

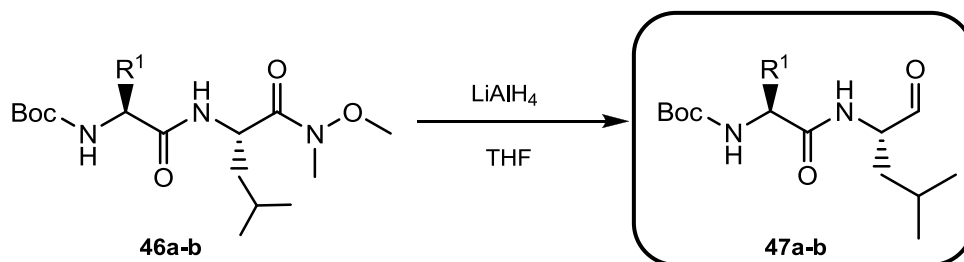
3.2.2.2. Síntese de *N*-metil-*N*-metóxi-(*S*)-2-((*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-fenilbutanamido)-4-metilpentanamida (46b)

Obteve-se um óleo amarelo, cuja purificação foi realizada por coluna flash usando *n*-hexano e acetato de etilo, na proporção de 3:2. O composto apresentou um rendimento de 60% (155 mg) e a seguinte análise espectroscópica:



¹H-RMN δ (400MHz, CDCl₃): 7,30-7,12 (m, ArH, 5H), 6,77-6,50 (d, $J = 6,4$ Hz, NHCH, 1H), 5,21-4,95 (m, NHCH+ NHCH, 2H), 4,24-4,03 (m, NHCH, 1H), 3,78 (s, OCH₃, 3H), 3,17 (s, NCH₃, 3H), 2,65 (t, $J = 8,0$ Hz, CH₂CH₂C₆H₅, 2H), 2,21-2,03 (m, CH₂CH₂C₆H₅, 1H), 1,93-1,83 (m, CH₂CH₂C₆H₅, 1H), 1,70-1,56 (m, CH₂CH(CH₃)₂, 2H), 1,51-1,45 (m, CH₂CH(CH₃)₂, 1H), 1,42 (s, C(CH₃)₃, 9H), 0,95-0,86 (m, CH₂CH(CH₃)₂, 6H) ppm

3.2.3. Síntese de aldeídos dipeptídicos

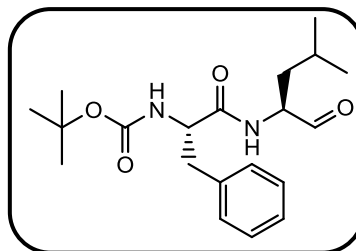


Método geral: A uma suspensão de *N*-metoxi-*N*-metilamida derivada de um dipéptido (1,0 mmol; 1,0 eq.), em THF seco (4 mL), a 0°C, em atmosfera inerte de N₂, foi adicionado LiAlH₄ (1,3 mmol; 1,3 eq.). A suspensão permaneceu nas condições reacionais descritas até ao consumo do material de partida.

Em seguida, adicionou-se éter dietílico (30 mL) lavando-se 3x com HCl 2M (15 mL), solução saturada de NaHCO₃ (15 mL) e solução saturada de NaCl (15 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e após filtração, o solvente foi evaporado a pressão reduzida.

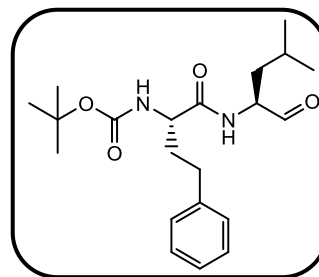
3.2.3.1. Síntese de (S)-2-((S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-fenilpropanamido)-4-metilpentanaldeído (47a)

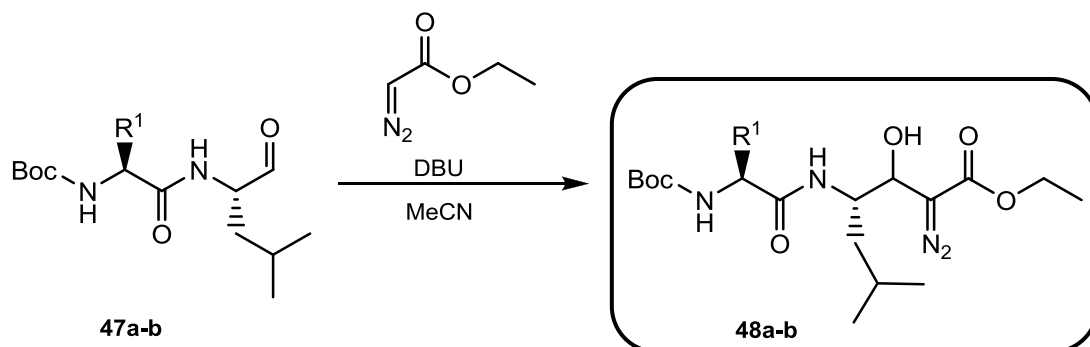
Obteve-se um óleo amarelo incolor (106 mg), que foi utilizado nas reacções seguintes sem ter sido submetido a processos de purificação adicionais.



3.2.3.2. Síntese de (S)-2-((S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-fenylbutanamido)-4-metilpentanaldeído (47b)

Obteve-se um óleo amarelo incolor (104 mg), que foi utilizado nas reacções seguintes sem ter sido submetido a processos de purificação adicionais.



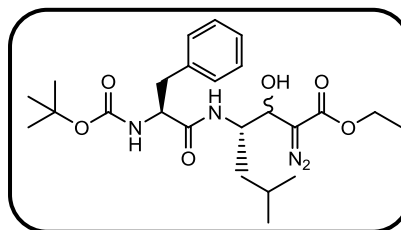
3.2.4. Síntese de α -dialzo- β -hidroxiésteres dipeptídicos

Método geral: A uma suspensão de aldeído (1,0 mmol; 1,0 eq.), em MeCN (4 mL), a 0°C, em atmosfera inerte de N₂, foi adicionada uma solução de EDA (1,5 mmol; 1,5 eq.) e logo em seguida DBU (0,15 mmol; 0,15 eq.). A suspensão permaneceu nas condições reacionais descritas até ao consumo do material de partida.

Em seguida, adicionou-se uma solução saturada de NaHCO₃ e extraiu-se 3x com diclorometano (10 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e após filtração, o solvente foi evaporado a pressão reduzida.

3.2.4.1. Síntese de (4S)-4-((S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-fenilpropanamido)-2-diazo-3-hidroxi-6-metilheptanoato de etilo (48a)

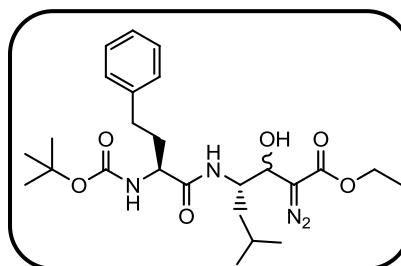
Obteve-se um óleo laranja, cuja purificação foi realizada por coluna flash usando *n*-hexano e acetato de etilo, na proporção de 3:2. O composto apresentou um rendimento de 76% (90 mg).



Apesar de ser ter conseguido o composto pretendido, não foi possível obtê-lo com um grau de pureza elevado, já que o seu espectro de RMN apresentou alguns sinais extra, para além dos esperados.

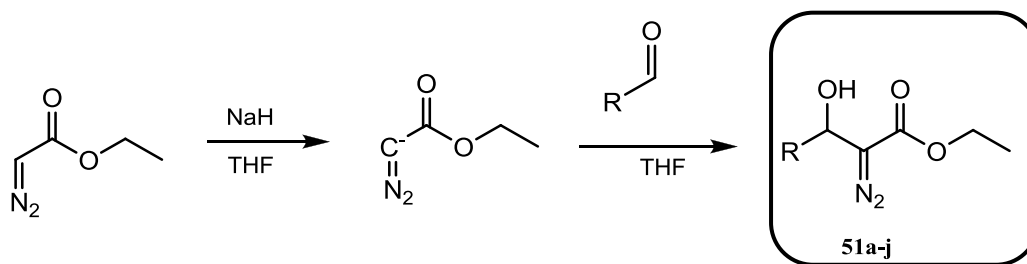
3.2.4.2. Síntese de (4S)-4-((S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-fenylbutamido)-2-diazo-3-hidroxi-6-metilheptanoato de etilo (48b)

Obteve-se um óleo laranja, cuja purificação foi realizada por coluna flash usando *n*-hexano e acetato de etilo, na proporção de 3:2. O composto apresentou um rendimento de 81% (99 mg).



Apesar de se ter conseguido o composto pretendido, não foi possível obtê-lo com um grau de pureza elevado, já que o seu espectro de RMN apresentou alguns sinais extra, para além dos esperados.

3.3. Síntese de α -diazó- β -hidroxiésteres contendo heterociclos e anéis aromáticos

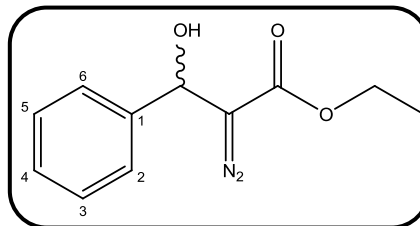


Método geral: A uma mistura de NaH (1,0 mmol; 1,4 eq.) em THF seco (4,5mL), a 0°C, em atmosfera inerte de N₂, foi adicionada lentamente uma solução de 2-diazoacetato de etilo (1,4 mmol; 1,4 eq.) em THF seco (0,5 mL). A suspensão permaneceu nas condições reacionais descritas durante um período de 30 minutos, sendo que nos 30 minutos subsequentes foi colocada à temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se uma solução do aldeído (1,0 mmol; 1,0 eq.) em THF seco (0,5 mL).

Deixou-se reagir à temperatura ambiente até ao consumo total do material de partida. Adicionou-se água destilada (20 mL) e extraiu-se com diclorometano (3 x 25 mL). A fase orgânica foi então seca com Na₂SO₄ e após filtração, evaporou-se o solvente a pressão reduzida.

3.3.1. Síntese de 2-diazo-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (51a)

Obteve-se um óleo amarelo, após 24h de reacção, cuja purificação foi realizada por coluna flash usando *n*-hexano e acetato de etilo, na proporção de 4:1. O composto apresentou um rendimento de 57% (60 mg) e a seguinte análise espectroscópica:



IV $\nu_{\text{máx}}$ (NaCl): 2096 (f, C=N₂), 1645 (f, C=O) cm⁻¹

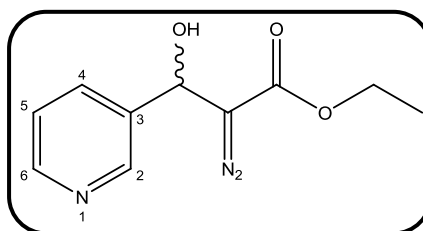
¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 7,50-7,29 (m, ArH, 5H), 5,92 (s, CHOH, 1H), 4,28 (q, *J* = 7,1 Hz, OCH₂, 2H), 2,93 (s, OH, 1H), 1,30 (t, *J* = 7,1 Hz, CH₃CH₂, 3H) ppm

¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 166,41 (C=O), 138,87 (C-1), 128,77 (C-3+C-5), 128,33 (C-4), 125,73 (C-2+C-6), 68,69 (CHOH), 61,23 (CH₂CH₃), 14,48 (CH₂CH₃) ppm

MS: M/Z (%): Obtida [M+Na]⁺ 243,02; Requer [M+Na]⁺ 243,07

3.3.2. Síntese de 2-diazo-3-hidroxi-3-(piridin-3-il)propanoato de etilo (51b)

Obteve-se um óleo amarelo, após 24h de reacção, cuja purificação foi realizada por coluna flash usando *n*-hexano e acetato de etilo, na proporção de 3:2. O composto apresentou um rendimento de 74% (79 mg) e a seguinte análise espectroscópica:



IV $\nu_{\text{máx}}$ (NaCl): 2096 (f, C=N₂), 1693 (f, C=O) cm⁻¹

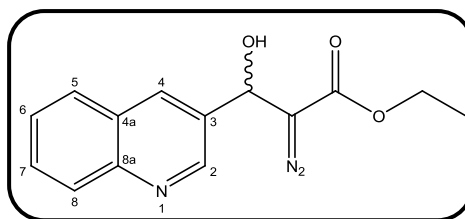
¹H-RMN δ (400MHz, CDCl₃): 8,70 (s, H-2, 1H), 8,58 (d, *J* = 4,0 Hz, H-6, 1H), 7,80 (d, *J* = 8,0 Hz, H-4, 1H), 7,35 (dd, *J* = 8,0 Hz, 4,0 Hz, H-5, 1H), 5,96 (s, CHOH, 1H), 4,29 (q, *J* = 8,0 Hz, OCH₂CH₃, 2H), 1,67 (s, CHOH, 1H), 1,30 (t, *J* = 8,0 Hz, CH₂CH₃) ppm

^{13}C -RMN δ (100 MHz, CDCl_3): 165,94 (C=O), 149,11 (C-2), 147,39 (C6), 133,97 (C4), 123,69 (C5+C3), 66,36 (CHOH), 61,33 (CH_2CH_3), 14,44 (CH_2CH_3) ppm

MS: M/Z (%): Obtida $[\text{M}+\text{H}]^+$ 222,00; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 243,96 Requer $[\text{M}+\text{H}]^+$ 222,08; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 244,06

3.3.3. Síntese de 2-diazo-3-hidroxi-3-(quinolin-3-il)propanoato de etilo (51c)

Obteve-se um óleo amarelo, após 24h de reacção, cuja purificação foi realizada por coluna flash usando *n*-hexano e acetato de etilo, na proporção de 3:2. O composto apresentou um rendimento de 60% (188 mg) e a seguinte análise espectroscópica:



IV $\nu_{\text{máx}}$ (NaCl): 2096 (f, C=N₂), 1693 (f, C=O) cm^{-1}

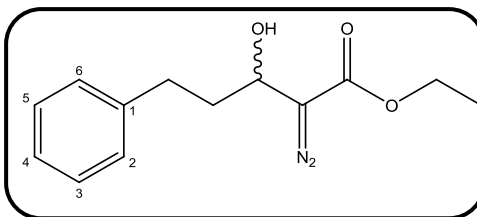
^1H -RMN: δ (400MHz, CDCl_3): 8,89 (s, H-2, 1H), 8,08 (d, $J = 8,4$ Hz, H-8, 1H), 7,84 (d, $J = 8,4$ Hz, H-5, 1H), 7,72 (s, H-4, 1H), 7,65 (t, $J = 7,7$ Hz, H-7, 1H), 7,50 (t, $J = 7,7$ Hz, H-6, 1H), 6,55 (s, CHOH , 1H), 4,20 (q, $J = 7,7$ Hz, CH_2CH_3 , 2H), 1,19 (t, $J = 7,7$ Hz, CH_2CH_3 , 3H) ppm

^{13}C -RMN δ (100 MHz, CDCl_3): 165,71 (C=O), 150,22 (C-2), 147,85 (C-8a), 129,98 (C-4), 129,62 (C-3), 127,35 (C-4a+C-7), 124,70 (C-8), 122,66 (C-5), 117,78 (C-6), 64,82 (CHOH), 61,46 (CH_2CH_3), 14,43 (CH_2CH_3) ppm

MS: M/Z (%): Obtida $[\text{M}+\text{H}]^+$ 272,00 Requer $[\text{M}+\text{H}]^+$ 272,10

3.3.4. Síntese de 2-diazo-3-hidroxi-5-fenilpentanoato de etilo (51d)

Obteve-se um óleo amarelo, após 24h de reacção, cuja purificação foi realizada por coluna flash usando *n*-hexano e acetato de etilo, na proporção de 4:1. O composto apresentou um rendimento de 79% (213 mg) e a seguinte análise espectroscópica



IV $\nu_{\text{máx}}$ (NaCl): 2092 (f, C=N₂), 1693 (f, C=O) cm⁻¹

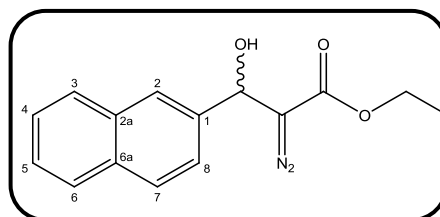
¹H-RMN δ (400MHz, CDCl₃): 7,27-7,09 (m, ArH, 5H), 4,60 (m, CHOH, 1H), 4,18 (q, *J* = 8,0 Hz, CH₂CH₃, 2H), 2,60-2,62 (m, C₆H₅CH₂CH₂, 2H), 1,79-2,04 (m, C₆H₅CH₂CH₂, 2H), 1,21 (t, *J* = 8,0 Hz, CH₂CH₃, 3H) ppm

¹³C-RMN δ (400MHz, CDCl₃): 166,60 (C=O), 140,89 (C-1), 128,54 (C-3+C-5), 128,46 (C-2+C-6), 126,17 (C-4), 66,00 (CHOH), 61,09 (CH₂CH₃), 35,07 (C₆H₅CH₂CH₂), 31,90 (C₆H₅CH₂CH₂), 14,48 (CH₂CH₃) ppm

MS: M/Z (%): Obtida [M+Na]⁺ 271,02 Requer [M+Na]⁺ 271,10

3.3.5. Síntese de 2-diazo-3-hidroxi-3-(naftalen-2-il)propanoato de etilo (51e)

Obteve-se um óleo amarelo, após 24h de reacção, cuja purificação foi realizada por coluna flash usando *n*-hexano e acetato de etilo, na proporção de 3:2. O composto, apresentou um rendimento de 60% (191 mg) e a seguinte análise espectroscópica:



IV $\nu_{\text{máx}}$ (NaCl): 2096 (f, C=N₂), 1693 (f, C=O) cm⁻¹

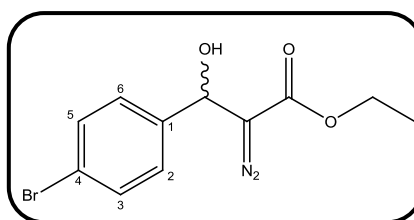
¹H-RMN δ (400MHz, CDCl₃): 7,95 (s, H-1, 1H), 7,91-7,80 (m, ArH, 3H), 7,54-7,43 (m, ArH, 3H), 6,09 (s, CHOH, 1H), 4,29 (q, *J* = 8,0 Hz, CH₂CH₃, 2H), 3,34 (s, OH, 1H), 1,30 (t, *J* = 8,0 Hz, CH₂CH₃, 3H) ppm

^{13}C -RMN δ (400MHz, CDCl_3): 166,46 (C=O), 136,21 (C-1), 133,23 (C-2a), 133,16 (C-6a), 128,72 (C-3), 128,20 (C-7), 127,75 (C-6), 126,45 (C-2), 126,34 (C-5), 124,71 (C-4), 123,59 (C-8), 68,87 ($\underline{\text{C}}\text{HOH}$), 61,28 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$), 14,84 ($\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm

MS: M/Z (%): Obtida $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 292,93 Requer $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 293,08

3.3.6. Síntese de 3-(4-bromofenil)-2-diazo-3-hidroxiopropanoato de etilo (51f)

Obteve-se um óleo castanho, após 24h de reacção, cuja purificação foi realizada por coluna flash usando *n*-hexano e acetato de etilo, na proporção de 3:2. O composto apresentou um rendimento de 41% (153 mg) e a seguinte análise espectroscópica:



IV ν_{max} (NaCl): 2100 (f, $\text{C}=\text{N}_2$), 1693 (f, $\text{C}=\text{O}$) cm^{-1}

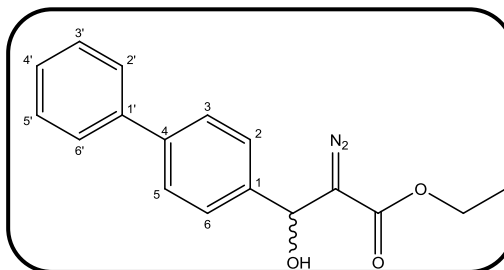
^1H -RMN δ (400MHz, CDCl_3): 7,44 (d, $J = 8,0$ Hz, H-3+H-5, 2H), 7,24 (d, $J = 8,0$ Hz, H-2+H6, 2H), 5,79 (s, $\underline{\text{C}}\text{HOH}$, 1H), 4,19 (q, $J = 8,0$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$, 2H), 3,25 (s, $\underline{\text{O}}\text{H}$, 1H), 1,22 (t, $\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$, 3H) ppm

^{13}C -RMN δ (400MHz, CDCl_3): 166,10 (C=O), 137,90 (C-1), 131,90 (C-3+C-5), 128,61 (C2+C6), 122,24 (C-4), 68,18 ($\underline{\text{C}}\text{HOH}$), 61,35 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$), 14,47 ($\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm

MS: M/Z (%): Obtida $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 320,85; Requer $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 320,98

3.3.7. Síntese de 3-(bifenil-4-il)-2-diazo-3-hidroxiopropanoato de etilo (51g)

Obteve-se um óleo amarelo, após 24h de reacção, cuja purificação foi realizada por coluna flash usando *n*-hexano e acetato de etilo, na proporção de 3:2. O composto apresentou um rendimento de 79% (223 mg) e a seguinte análise espectroscópica:



IV $\nu_{\text{máx}}$ (NaCl): 2096 (f, C=N₂), 1693 (f, C=O) cm⁻¹

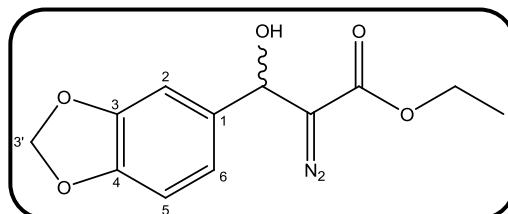
¹H-RMN δ (400MHz, CDCl₃): 6,95-6,76 (m, ArH, 9H), 5,96 (d, J = 8,0 Hz, CHOH, 1H), 4,27 (q, J = 8,0 Hz, CH₂CH₃, 2H), 3,04 (s, CHOH, 1H), 1,30 (t, J = 8,0 Hz, CH₂CH₃, 3H) ppm

¹³C-RMN δ (400MHz, CDCl₃): 165,35 (C=O), 146,99 (C-1), 146,50 (C-1'), 146,08 (C-4), 133,82 (C-6), 131,59 (C-2), 119,50 (C-5'), 118,22 (C-3'), 107,37 (C-5), 107,20 (C-3), 105,35 (C-4'), 100,21 (C-2'), 100,00 (C-6'), 67,55 (CHOH), 60,22 (CH₂CH₃), 13,46 (CH₂CH₃) ppm

MS: M/Z (%): Obtida [M+Na]⁺ 318,96 Requer [M+Na]⁺ 319,10

3.3.8. Síntese de 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-diazo-3-hidroxiopropanoato de etilo (51h)

Obteve-se um óleo castanho, após 46h de reacção, cuja purificação foi realizada por coluna flash usando *n*-hexano e acetato de etilo, na proporção de 3:2. O composto apresentou um rendimento de 4% (11 mg) e a seguinte análise espectroscópica:



IV $\nu_{\text{máx}}$ (NaCl): 2096 (f, C=N₂), 1693 (f, C=O) cm⁻¹

¹H-RMN δ (400MHz, CDCl₃): 7,61-7,56 (t, J = 8,0 Hz, H-2, 1H), 7,50 (d, J = 8,0 Hz, H-3', 2H), 7,45 (t, J = 8,0 Hz, H-6, 1H), 7,35 (t, J = 8,0 Hz, H-5, 1H), 5,96 (d,

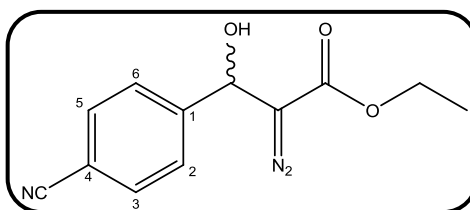
$J = 4,0$ Hz, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{O}}\underline{\text{H}}$, 1H), 4,29 (q, $J = 8,0$ Hz, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$, 2H), 3,11 (s, $\underline{\text{O}}\underline{\text{H}}$, 1H), 1,31 (t, $J = 8,0$ Hz, $\text{C}\underline{\text{H}}_2\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$, 3H) ppm

$^{13}\text{C-RMN}$ δ (400MHz, CDCl_3): 166,32 (C=O), 141,24 (C-3), 140,51 (C-4), 137,80 (C-1), 128,84 (C-6), 127,51 (C-2), 127,12 (C-5), 126,22 (C-3'), 68,64 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{O}}\underline{\text{H}}$), 61,26 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 14,52 ($\text{C}\underline{\text{H}}_2\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$) ppm

MS: M/Z (%): Obtida $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 286,93 Requer $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 287,06

3.3.9. Síntese de 3-(4-cianofenil)-2-diazo-3-hidroxipropanoato de etilo (51i)

Obteve-se um óleo amarelo escuro, após 48h de reacção, cuja purificação foi realizada por coluna flash usando *n*-hexano e acetato de etilo, na proporção de 4:1. O composto apresentou um rendimento de 13% (28 mg) e a seguinte análise espectroscópica:



IV $\nu_{\text{máx}}$ (NaCl): 2231,64 (f, $\text{C}\equiv\text{N}$), 2096 (f, $\text{C}=\text{N}_2$), 1693 (f, $\text{C}=\text{O}$) cm^{-1}

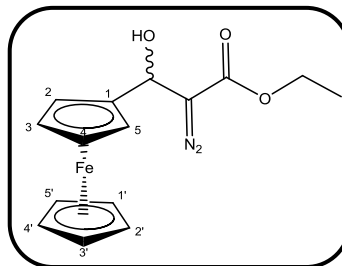
$^1\text{H-RMN}$ δ (400MHz, CDCl_3): 7,67 (d, $J = 8,0$ Hz, H-3+H-5, 2H), 7,56 (d, $J = 8,0$ Hz, H-2+H-6, 2H), 5,92 (s, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{O}}\underline{\text{H}}$, 1H), 4,25 (q, $J = 8,0$ Hz, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$, 2H), 1,28 (t, $\text{C}\underline{\text{H}}_2\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$, 3H) ppm

$^{13}\text{C-RMN}$ δ (400MHz, CDCl_3): 164,83 (C=O), 143,53 (C-1), 131,56 (C-3+C-5), 125,54 (C-2+C-6), 117,50 (CN), 110,98 (C-4), 66,89 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{O}}\underline{\text{H}}$), 60,45 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 13,41 ($\text{C}\underline{\text{H}}_2\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$) ppm

MS: M/Z (%): Obtida $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 268,00 Requer $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 268,06

3.3.10. Síntese de 2-diazo-1-ferrocenil-3-hidroxiopropanoato de etilo (51j)

Obteve-se um óleo castanho, após 30h de reacção, cuja purificação foi realizada por coluna flash usando *n*-hexano e acetato de etilo, na proporção de 3:2. O composto apresentou um rendimento de 13% (56 mg) e a seguinte análise espectroscópica:



IV $\nu_{\text{máx}}$ (NaCl): 2094 (f, C=N₂), 1693 (f, C=O) cm⁻¹

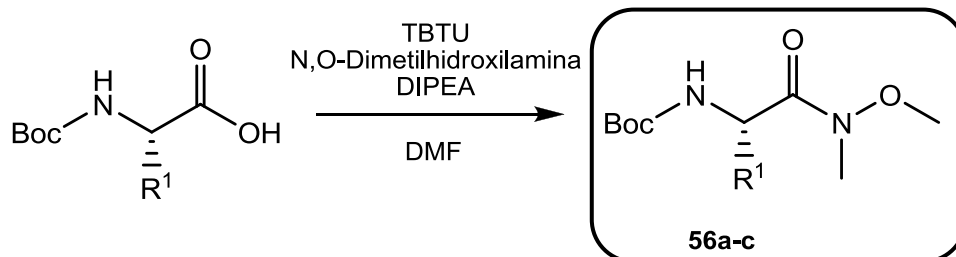
¹H-RMN δ (400MHz, CDCl₃): 5,50 (t, *J* = 4,0 Hz, CHOH, 1H), 4,32-4,17 (m, ArH + CH₂CH₃, 11H), 2,86 (s, CHOH, 1H), 1,27 (t, *J* = 8,0 Hz, CH₂CH₃, 3H) ppm

¹³C-RMN δ (400MHz, CDCl₃): 166,84 (C=O), 88,67 (Cf-1), 70,02 (Cf), 69,67 (Cf), 68,82 (Cf), 68,55 (Cf), 68,20 (Cf), 67,99 (Cf), 66,55 (Cf), 65,72 (Cf), 65,27 (CHOH), 61,02 (CH₂CH₃), 25,61 (Cf), 14,52 (CH₂CH₃) ppm

MS: M/Z (%): Obtida [M+Na]⁺ 250,92 Requer [M+Na]⁺ 251,03

3.4. Síntese de 3-metileno-indolin-2-onas derivados de aminoácidos

3.4.1. Síntese de Amidas de Weinreb, derivadas de aminoácidos

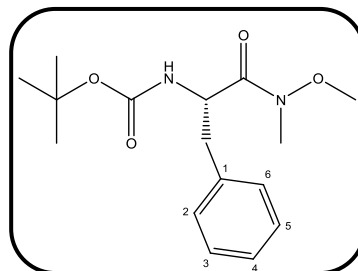


Método Geral: Um tubo fechado de microondas, contendo o aminoácido *N*-protegido (1,0 mmol; 1,0 eq.), TBTU (1,1 mmol; 1,1 eq.), N,O-Dimetilhidroxilamina (1,1 mmol; 1,1 eq.) e DIPEA (3,0 mmol; 3,0 eq.) em DMF (4 mL), foi submetido a radiação por microondas, nas condições operacionais de 55°C a 200W, nos primeiros 16 minutos e de 60°C a 300W, nos 16 minutos seguintes.

Em seguida, adicionou-se diclorometano (15 mL) e lavou-se 3x a fase orgânica com água destilada (20 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e após filtração, o solvente foi evaporado a pressão reduzida.

3.4.1.1. Síntese de *N*-metil-*N*-metóxi-(*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-fenilpropanamida (56a)

Obteve-se um óleo amarelo cuja purificação foi realizada por coluna flash usando *n*-hexano e acetato de etilo, na proporção de 2:3. O composto apresentou um rendimento de 34% (106 mg) e a seguinte análise espectroscópica:

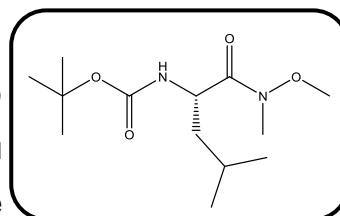


¹H-RMN δ (400MHz, CDCl₃): 7,31-7,13 (m, ArH, 5H), 5,30 (s, NHCH, 1H), 4,94 (d, $J = 8,0$ Hz, NHCH, 1H), 3,65 (s, OCH₃, 3H), 3,16 (s, NCH₃, 3H), 3,09-3,00 (m, CH₂C₆H₅, 1H), 2,90-2,81 (m, CH₂C₆H₅, 1H), 1,39 (s, C(CH₃)₃, 9H) ppm

Os dados espectroscópicos estão de acordo com a literatura.⁷²

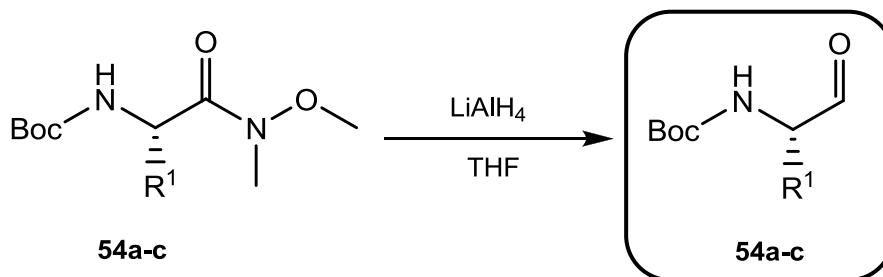
3.4.1.2. Síntese de *N*-metil-*N*-metóxi-(*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-metilpentanamida (56b)

Obteve-se um óleo amarelo cuja purificação foi realizada por coluna flash usando *n*-hexano e acetato de etilo, na proporção de 2:3. O composto apresentou um rendimento de 80% (218 mg) e a seguinte análise espectroscópica:



¹H-RMN δ (400MHz, CDCl₃): 5,05 (s, NHCH, 1H), 4,72 (s, NHCH, 1H), 3,78 (s, OCH₃, 3H), 3,19 (s, NCH₃, 3H), 1,76-1,61 (m, CH₂CH(CH₃)₂+CH₂CH(CH₃)₂, 3H), 1,43 (s, C(CH₃)₃, 9H), 0,94 (d, $J = 8,0$ Hz, CH₂CH(CH₃)₂, 6H) ppm

Os dados espectroscópicos estão de acordo com a literatura.⁷³

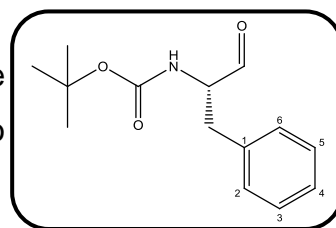
3.4.2. Síntese de aldeídos, derivados de aminoácidos

Método geral: A uma suspensão de *N*-metoxi-*N*-metilamida (1,0 mmol; 1,0 eq.) derivada de um aminoácido, diluída em THF seco (4 mL), a 0°C, em atmosfera inerte de N₂, foi adicionado LiAlH₄ (1,3 mmol; 1,3 eq.). A suspensão permaneceu nas condições reacionais descritas até à extinção do material de partida.

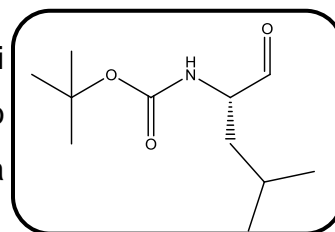
Em seguida, adicionou-se éter dietílico (30 mL) lavando-se 3x a fase orgânica, com HCl 2M (15 mL), solução saturada de NaHCO₃ (15 mL) e solução saturada de NaCl (15 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e após filtração, o solvente foi evaporado a pressão reduzida.

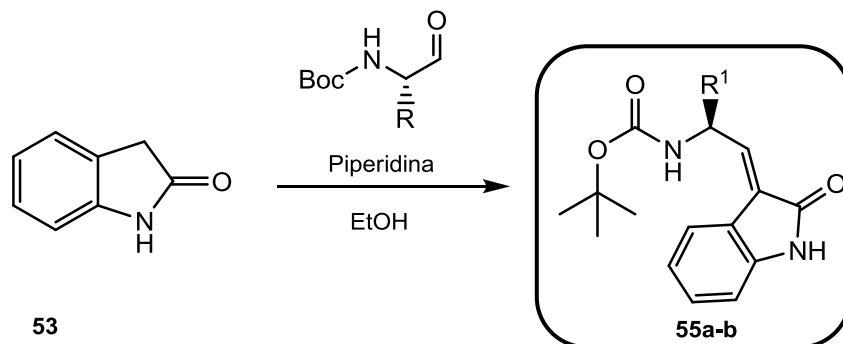
3.4.2.1. Síntese de (S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-fenilpropanaldeído (54a)

Obteve-se um óleo amarelo translúcido (60 mg), que foi utilizado nas reacções seguintes sem ter sido submetido a processos de purificação adicionais.

**3.4.2.2. Síntese de (S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-metilpentanaldeído (54b)**

Obteve-se um óleo amarelo translúcido (125 mg), que foi utilizado nas reacções seguintes sem ter sido submetido a processos de purificação adicionais, devido à sua conhecida instabilidade.



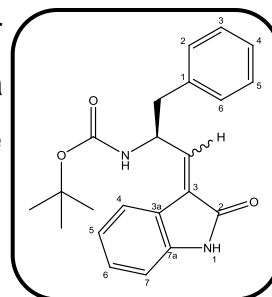
3.4.3. Síntese de 3-metileno-indolin-2-onas derivadas de aminoácidos

Método geral: Uma suspensão de indolin-2ona (1,0 mmol; 1,0 eq.), aldeído (1,2 mmol; 1,2 eq.) e piperidina (0,1 mmol; 0,1 eq.), em etanol (2 mL), foi agitada a refluxo, sob atmosfera inerte de azoto. A reacção permaneceu nas condições reaccionais descritas até ao consumo total do material de partida.

Em seguida, evaporou-se o solvente a pressão reduzida.

3.4.3.1. Síntese de (S)-3-(2-*tert*-butoxicarbonilamino-3-fenilpropilideno)indolin-2-ona (55a)

Obteve-se um óleo amarelo cuja purificação foi realizada por coluna flash usando *n*-hexano e acetato de etilo, na proporção de 2:3. O composto apresentou um rendimento de 29% (20 mg) e a seguinte análise espectroscópica:



IV $\nu_{\text{máx}}$ (NaCl): 3307 (f, NH); 1712-1678 (Sinais sobrepostos: C=O; C=O; C=C) cm^{-1}

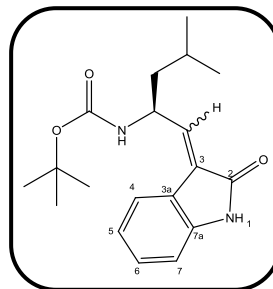
^1H -RMN δ (400MHz, CDCl_3): 11,91 (s, NH, 1H), 11,16 (s, NH, 1H), 8,41 (d, $J = 8,0$ Hz, H-4^{Ox}, 1H), 7,51 (d, $J = 8,0$ Hz, H-6^{Ox}, 1H), 7,42 (t, $J = 8,0$ Hz, H-5^{Ox}, 1H), 7,35-7,26 (m, ArH, 5H), 6,89 (t, $J = 8,0$ Hz, OCCCH, 1H), 5,87 (s, H-7^{Ox}, 1H), 4,24 (s, NHCH, 1H), 3,55 (d, $J = 4,9$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, 2H), 1,49 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, 9H) ppm

^{13}C -RMN δ (400MHz, CDCl_3): 194,36 (C=O), 160,42 (C=O), 154,73 (C-7a^{Ox}), 151,56 (C-1^{Ph}), 142,73 (C-3a^{Ox}), 133,64 (C-5^{Ox}), 129,65 (C-3^{Ph}), 129,29 (C-5^{Ph}), 129,14 (C-6^{Ox}), 128,65 (C-2^{Ph}), 127,22 (C-6^{Ph}), 126,93 (C-4^{Ph}), 120,61 (C-4^{Ox}), 120,43 (OCCCH), 102,12 (C-7^{Ox}), 81,67 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 45,08 ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 39,43 (CHNH), 29,72 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm

MS: M/Z (%): Obtida $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 387,08 Requer $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 387,17

3.4.3.2. Síntese de (S)-3-(2-*tert*-butoxicarbonilamino-4-metilpentilideno)indolin-2-ona (55b)

Obteve-se um óleo amarelo cuja purificação foi realizada por coluna flash usando *n*-hexano e acetato de etilo, na proporção de 2:3. O composto apresentou um rendimento de 40% (61 mg) e a seguinte análise espectroscópica:



IV $\nu_{\text{máx}}$ (NaCl): 3307 (f, NH); 1741-1645 (Sinais sobrepostos: C=O; C=O; C=C) cm^{-1}

^1H -RMN δ (400MHz, CDCl_3): mix (2:1) 9,27-8,74 (m, $\text{NH}+\text{NH}$, 2H), 8,50 (d, $J = 8,0$ Hz, H-4, 1H), 7,58-7,45 (m, H-6^{Ox}, 1H), 7,40-7,29 (m, H-5^{Ox}, 1H), 7,98-6,92 (m, H-7^{Ox}, 1H) 6,92-6,82 (m, OCCCH , 1H), 2,66-2,51 (m, $\text{NHCH}+\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, 3H), 2,38 (s, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, 1H), 1,45 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, 9H), 1,06-0,97 (m, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, 3H) ppm

^{13}C -RMN δ (400MHz, CDCl_3): 201,10 (C=O), 170,18 (C=O), 143,68 (C-7a^{Ox}), 141,89 (C-3^{Ox}), 140,16 (C-3a^{Ox}), 132,94 (C-5^{Ox}), 129,11 (C-4^{Ox}), 123,71-121,58 (C-6^{Ox}+ OCCCH), 110,25 (C-7^{Ox}), 79,75 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 53,91 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 38,36 (CHNH), 28,25 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25,16 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 22,61 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) ppm

MS: M/Z (%): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 353,14 Requer $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 353,18

IV. Referências Bibliográficas

1. Girard MP, Reed ZH, Friede M, Kieny MP. "A review of human vaccine research and development: Malaria". *Vaccine*. 2007;25(9):1567-80.
2. WHO. "World Health Statistics". 2010.
3. Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. "Clinical review: Severe malaria". *Crit Care*. 2003;7(4):315-23.
4. Rosenthal PJ. "Proteases of malaria parasites: New targets for chemotherapy". *Emerg Infect Dis*. 1998;4(1):49-57.
5. Ettari R, Bova F, Zappala M, Grasso S, Micale N. "Falcipain-2 Inhibitors". *Med Res Rev*. 2010;30(1):136-67.
6. Driessen GJ, Pereira RR, Brabin BJ, Hartwig NG. "Imported malaria in children: a national surveillance in the Netherlands and a review of European studies". *Eur J Public Health*. 2008;18(2):184-8.
7. Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SHI, Alonso PL, Collins FH, et al. "Malaria: progress, perils, and prospects for eradication". *J Clin Invest*. 2008;118(4):1266-76.
8. Hilgenfeld R, Hogg T, Nagarajan K, Herzberg S, Chen LL, Shen X, et al. "Structural and functional characterization of falcipain-2, a hemoglobinase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*". *J Biol Chem*. 2006;281(35):25425-37.
9. Rosenthal PJ. "Cysteine proteases of malaria parasites". *Int J Parasitol*. 2004;34(13-14):1489-99.
10. Rosenthal PJ. "Artesunate for the Treatment of Severe *Falciparum* Malaria". *New Engl J Med*. 2008;358(17):1829-36.
11. Figtree M, Lee R, Bain L, Kennedy T, Mackertich S, Urban M, et al. "*Plasmodium knowlesi* in Human, Indonesian Borneo". *Emerg Infect Dis*. 2010;16(4):672-4.
12. Ramjee MK, Flinn NS, Pemberton TP, Quibell M, Wang Y, Watts JP. "Substrate mapping and inhibitor profiling of falcipain-2, falcipain-3 and berghepain-2: implications for peptidase anti-malarial drug discovery". *Biochem J*. 2006;399:47-57.
13. LaCount DJ, Vignali M, Chettier R, Phansalkar A, Bell R, Hesselberth JR, et al. "A protein interaction network of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*". *Nature*. 2005;438(7064):103-7.
14. Vale N, Moreira R., Gomes P. Quimioterapia da malária - um século no desenvolvimento de antimaláricos. *Bol Soc Port Quim*. 2005;99:61-73.
15. Okombo J, Ohuma E, Picot S, Nzila A. "Update on genetic markers of quinine resistance in *Plasmodium falciparum*". *Mol Biochem Parasitol*. 2011;177(2):77-82.
16. Barreiro EJ, Kümmerle AE, Fraga CAM. "The Methylation Effect in Medicinal Chemistry". *Chem Rev*. 2011;111(9):5215-46.
17. França TCC, Santos MGd, Figueroa-Villar JD. "Malária: aspectos históricos e quimioterapia". *Quim Nov*. 2008;31:1271-8.
18. Meunier B, Robert A, Benoit-Vical F, Dechy-Cabaret O. "From classical antimalarial drugs to new compounds based on the mechanism of action of artemisinin". *Pure Appl Chem*. 2001;73(7):1173-88.
19. Price RN, Uhlemann A-C, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, et al. "Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfdmr1* gene copy number". *The Lancet*. 364(9432):438-47.

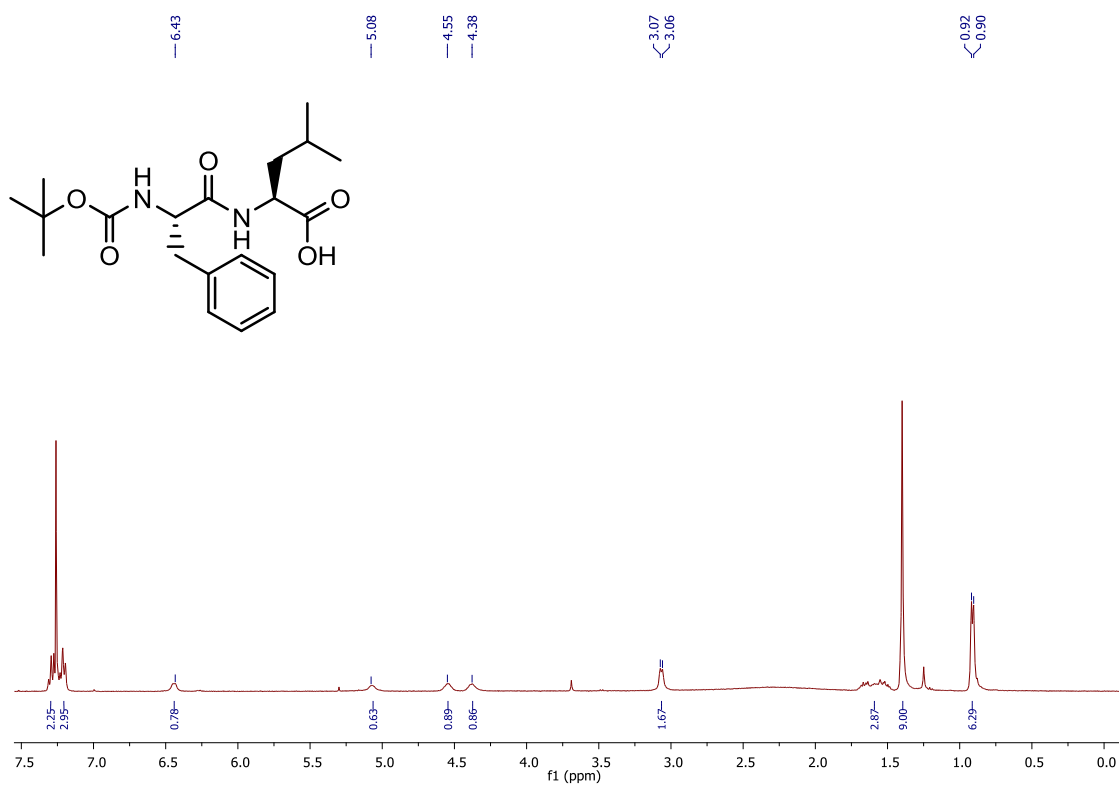
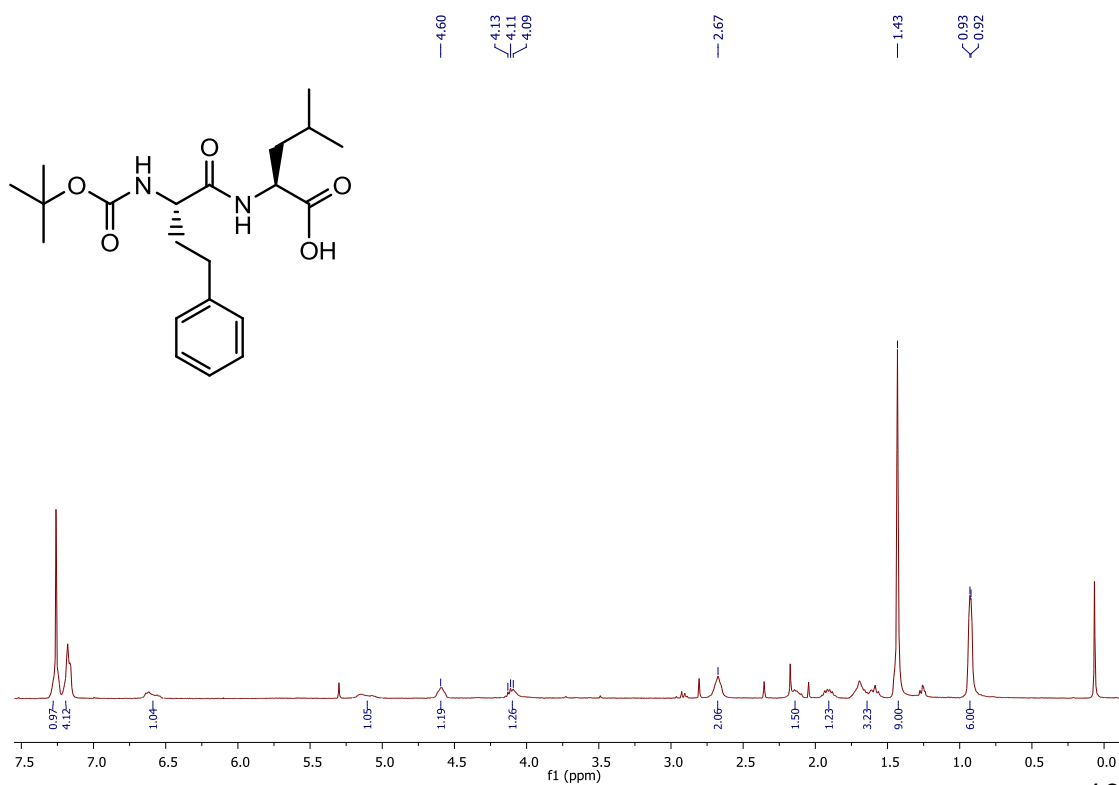
20. Stephen T. "Mefloquine neurotoxicity: A literature review". *Travel Med Infect Dis.* 2009;7(1):2-6.
21. Hasugian AR, Tjitra E, Ratcliff A, Siswanto H, Kenangalem E, Wuwung RM, et al. "*In Vivo* and *In Vitro* Efficacy of Amodiaquine Monotherapy for Treatment of Infection by Chloroquine-Resistant *Plasmodium vivax*". *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(3):1094-9.
22. Nathaniel C. "The prisoner as model organism: malaria research at Stateville Penitentiary". *Stud Hist Philos M P.* 2009;40(3):190-203.
23. Vale N, Moreira R, Gomes P. "Primaquine revisited six decades after its discovery". *Eur J Med Chem.* 2009;44(3):937-53.
24. Bouchaud O, Imbert P, Touze J, Dodo A, Danis M, Legros F. "Fatal cardiotoxicity related to halofantrine: a review based on a worldwide safety data base". *Malar J.* 2009;8(1):289.
25. Efferth T, Romero MR, Wolf DG, Stamminger T, Marin JJG, Marschall M. "The Antiviral Activities of Artemisinin and Artesunate". *Clin Inf Dis.* 2008;47(6):804-11.
26. Noedl H, Socheat D, Satimai W. "Artemisinin-Resistant Malaria in Asia". *New Engl J Med.* 2009;361(5):540-1.
27. Malhotra P, Korde R, Bhardwaj A, Singh R, Srivastava A, Chauhan VS, et al. "A prodomain peptide of *Plasmodium falciparum* cysteine protease (falcipain-2) inhibits malaria parasite development". *J Med Chem.* 2008;51(11):3116-23.
28. Rosenthal PJ, Pandey KC, Singh N, Arastu-Kapur S, Bogyo M. "Falstatin, a cysteine protease inhibitor of *Plasmodium falciparum*, facilitates erythrocyte invasion". *Plos Pathog.* 2006;2(11):1031-41.
29. Otto HH, Schirmeister T. Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem Rev.* 1997;97(1):133-71.
30. Heine K, Taghavi A, Kalberlah F. "Project summary: a critical synopsis of mechanisms of action of low-dose xenobiotics in mammalian organisms as a basis for assessing aggregated effects of chemical mixtures and identifying "new" toxicological end points". *Environ Sci Eur.* 2011;23(1):27.
31. Powers JC, Asgian JL, Ekici OD, James KE. "Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases". *Chem Rev.* 2002;102(12):4639-750.
32. Santos MMM, Moreira R. "Michael acceptors as cysteine protease inhibitors". *Mini-Rev Med Chem.* 2007;7(10):1040-50.
33. Machon U, Büchold C, Stempka M, Schirmeister T, Gelhaus C, Leippe M, et al. "On-Bead Screening of a Combinatorial Fumaric Acid Derived Peptide Library Yields Antiplasmodial Cysteine Protease Inhibitors with Unusual Peptide Sequences". *J Med Chem.* 2009;52(18):5662-72.
34. Muregi FW, Ishih A. "Next-generation antimalarial drugs: hybrid molecules as a new strategy in drug design". *Drug Dev Res.* 2010;71(1):20-32.
35. Olson JE, Lee GK, Semenov A, Rosenthal PJ. "Antimalarial effects in mice of orally administered peptidyl cysteine protease inhibitors". *Bio & Med Chem.* 1999;7(4):633-8.
36. Leary R, Shaw E. "Inactivation of cathepsin B1 by diazomethyl ketones". *Biochem Biophys Res Commun.* 1977;79(3):926-31.
37. Hosmane RS, Liebman JF. "Paradigms and paradoxes: Diazomethane and ethyl diazoacetate: The role of substituent effects on stability". *Struct Chem.* 2002;13(5-6):501-3.

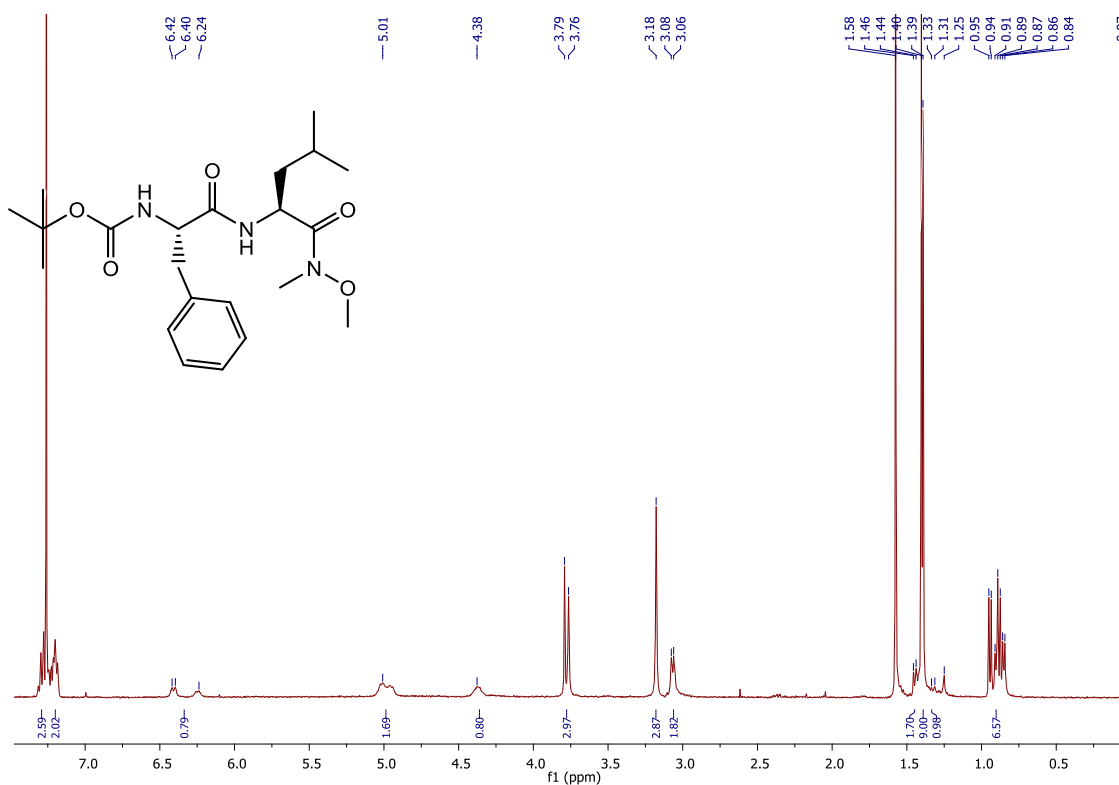
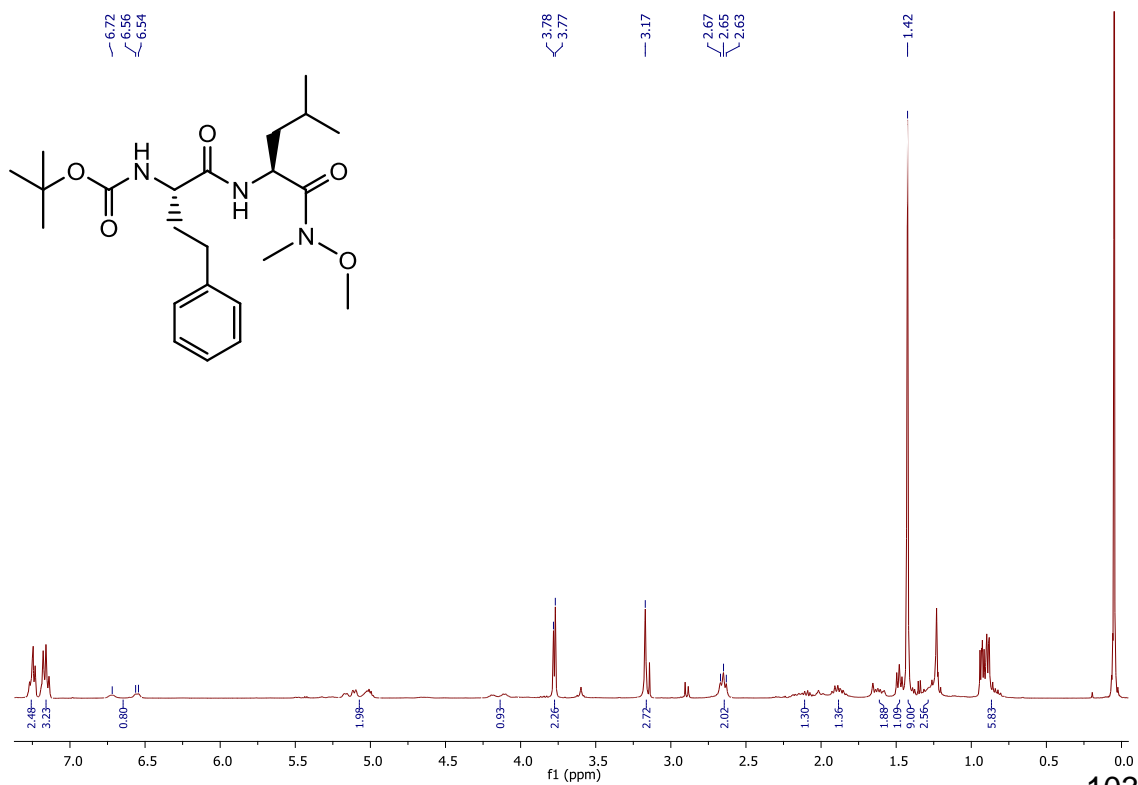
38. Tarnowska M, Oldziej S, Liwo A, Kania P, Kasprzykowski F, Grzonka Z. "Mndo Study of the Mechanism of the Inhibition of Cysteine Proteinases by Diazomethyl Ketones". *Eur Biophys J Biophys*. 1992;21(3):217-22.
39. Ferreira VF, Pereira LOR, Souza MCBVd, Cunha AC. Compostos a-diazo carbonílicos: uma estratégia atraente para a síntese orgânica. *Quim Nov*. 2001;24:540-53.
40. Pinto A. Design, Síntese e Bio-avaliação de inibidores de Cisteína. Lisboa: Universidade de Lisboa; 2010, Tese de Mestrado.
41. Kumar SP, Gut J, Guedes RC, Rosenthal PJ, Santos MMM, Moreira R. "Design, synthesis and evaluation of 3-methylene-substituted indolinones as antimalarials". *Eur J Med Chem*. 2011;46(3):927-33.
42. Ferreira AMD, Cerchiaro G. "Oxindoles and copper complexes with oxindole-derivatives as potential pharmacological agents". *J Brazil Chem Soc*. 2006;17(8):1473-85.
43. Welsh WJ, Peng YY, Keenan SM. "Structural model of the Plasmodium CDK, Pfmrk, a novel target for malaria therapeutics". *J Mol Graph Model*. 2005;24(1):72-80.
44. Rudrangi P, Bontha V, Manda V, Bethi S. "Oxindoles and Their Pharmaceutical Significance- an Overview". *Asian J Research Chem*. 2011;4(3):335-8.
45. Geyer JA, Prigge ST, Waters NC. "Targeting malaria with specific CDK inhibitors. Bba-Proteins Proteom". 2005;1754(1-2):160-70.
46. Woodard CL, Li ZY, Kathcart AK, Terrell J, Gerena L, Lopez-Sanchez M, et al. "Oxindole-based compounds are selective inhibitors of Plasmodium falciparum cyclin dependent protein kinases". *J Med Chem*. 2003;46(18):3877-82.
47. Xiao Z, Waters NC, Woodard CL, Li Z, Li P-K. "Design and synthesis of pfmrk inhibitors as potential antimalarial agents". *Bioorg Med Chem Lett*. 2001;11(21):2875-8.
48. Dluzewski AR, Garcia CR. "Inhibition of invasion and intraerythrocytic development of Plasmodium falciparum by kinase inhibitors". *Experientia*. 1996;52(6):621-3.
49. Dubey VK, Pande M, Singh BK, Jagannadham MV. "Papain-like proteases: Applications of their inhibitors". *Afr J Biotechnol*. 2007;6(9):1077-86.
50. Santagada V, Fiorino F, Perissutti E, Severino B, De Filippis V, Vivenzio B, et al. "Microwave-enhanced solution coupling of the alpha,alpha-dialkyl amino acid, Aib". *Tetrahedron Lett*. 2001;42(31):5171-3.
51. Balalaie S, Mahdidoust, M., Eshaghi-Najafabadi, R. "2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Tetrafluoroborate as an Efficient Coupling Reagent for the Amidation and Phenylhydrazination of Carboxylic Acids at Room Temperature". *J Iran Chem Soc*. 2007;4(3):364-9.
52. Aragão V. Sobre a síntese de furanoelíngolidos pela reacção de Diels-Alder. São Paulo; 2003, Tese de Mestrado.
53. Cunha AC, Paixão FMd, Souza MCBVd, Ferreira VF. Cloreto isocianúrico e cloreto cianúrico: aspectos gerais e aplicações em síntese orgânica. *Quim Nov*. 2006;29:520-7.
54. Fehrentz J-A, Castro B. "An Efficient Synthesis of Optically Active α -(t-Butoxycarbonylamino)-aldehydes from α -Amino Acids". *Synthesis*. 1983;1983(08):676,8.
55. Nahm S, Weinreb SM. "N-Methoxy-N-Methylamides as Effective Acylating Agents". *Tetrahedron Lett*. 1981;22(39):3815-8.

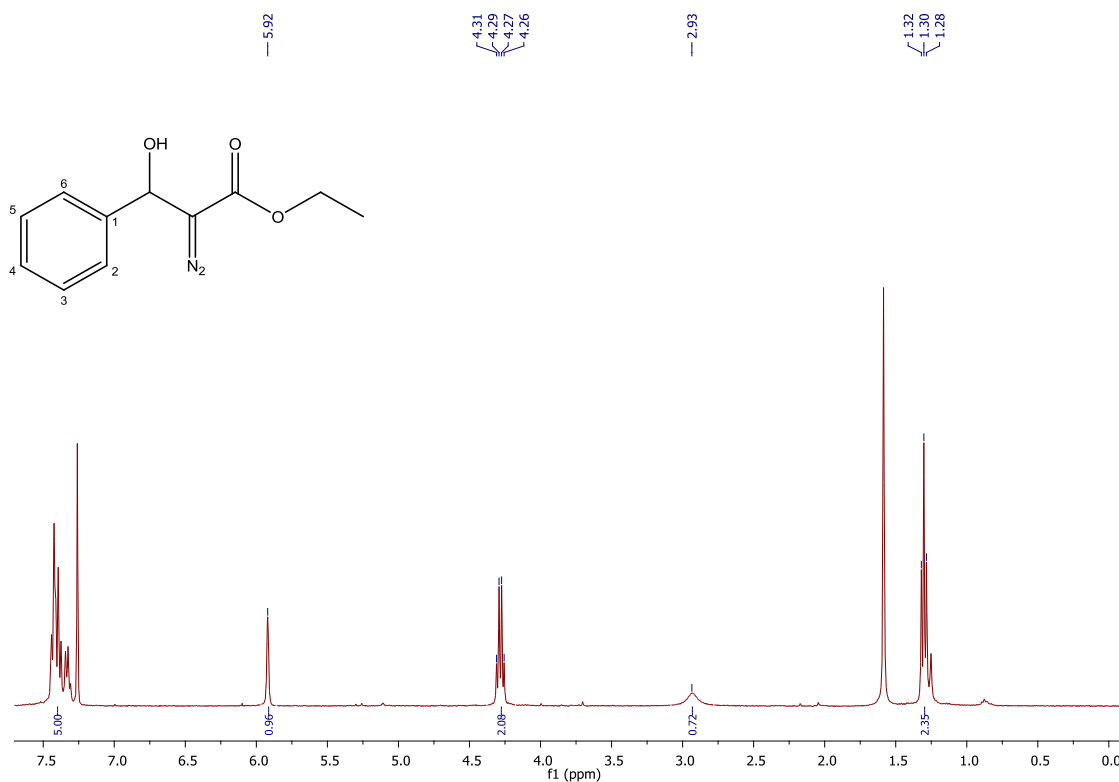
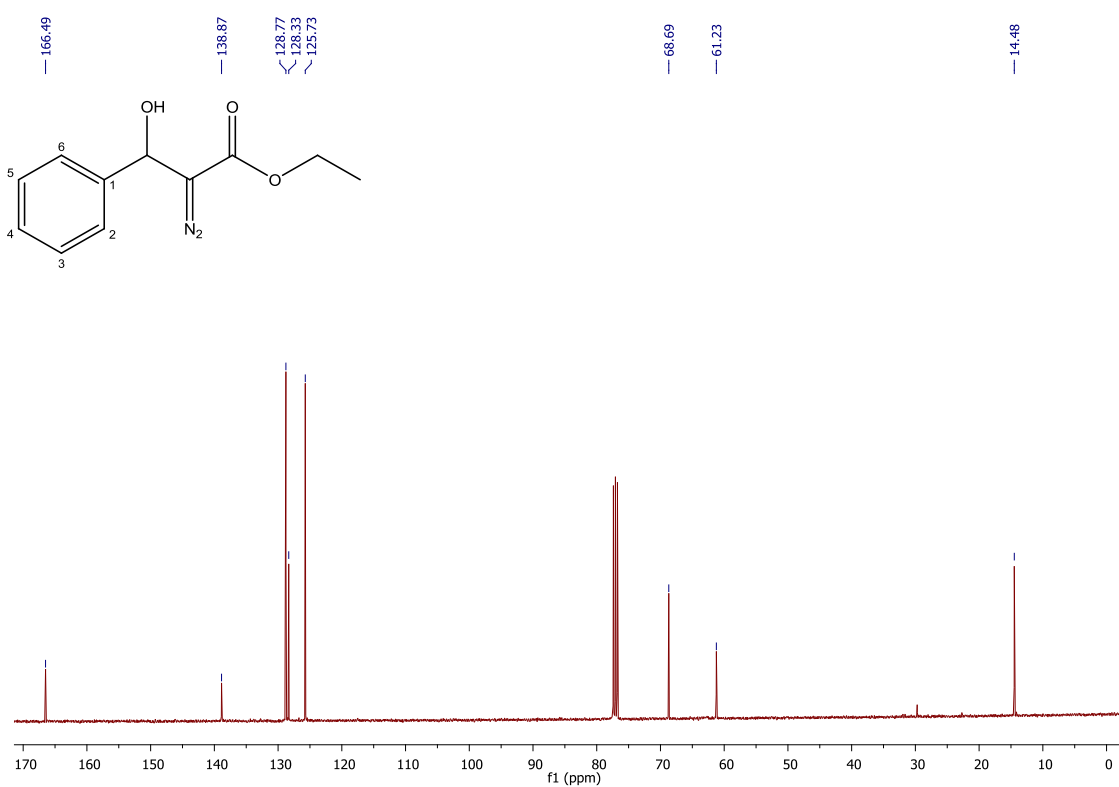
56. Ganneau C, Moulin A, Demange L, Martinez J, Fehrentz J-A. "The epimerization of peptide aldehydes—a systematic study". *J Pept Sci.* 2006;12(7):497-501.
57. Jiang N, Wang J. "DBU-promoted condensation of acyldiazomethanes to aldehydes and imines under catalytic conditions". *Tetrahedron Lett.* 2002;43(7):1285-7.
58. Candeias NR, Afonso CAM. "Developments in the Photochemistry of Diazo Compounds". *Curr Org Chem.* 2009;13(7):763-87.
59. Maas G. "New Syntheses of Diazo Compounds". *Ang Chem Int Ed.* 2009;48(44):8186-95.
60. Jiang N, Qu Z, Wang J. "1,2-Aryl and 1,2-Hydride Migration in Transition Metal Complex Catalyzed Diazo Decomposition: A Novel Approach to α -Aryl- β -enamino Esters". *Organic Letters.* 2001;3(19):2989-92.
61. Scalercio S. Estudo teórico do mecanismo redox de derivados quinolínicos na actividade antimalárica. Pará: Universidade Federal do Pará; 2010, Tese de Mestrado.
62. Silva C, Ribeiro A, Ferreira D, Veiga F. Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral. *Rev Bras Cienc Farm.* 2002;38:125-40.
63. Biot C, Glorian G, Maciejewski LA, Brocard JS, Domarle O, Blampain G, et al. "Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of a new ferrocene-chloroquine analogue". *J Med Chem.* 1997;40(23):3715-8.
64. Daher W, Biot C, Fandeur T, Jouin H, Pelinski L, Viscogliosi E, et al. "Assessment of Plasmodium falciparum resistance to ferroquine (SSR97193) in field isolates and in W2 strain under pressure". *Malar J.* 2006;5(1):11.
65. Biot C, Taramelli D, Forfar-Bares I, Maciejewski LA, Boyce M, Nowogrocki G, et al. "Insights into the mechanism of action of ferroquine. Relationship between physicochemical properties and antiplasmodial activity". *Mol Pharmaceut.* 2005;2(3):185-93.
66. Francisco A, Vargas, M. Ferroquina: o antimalárico do futuro. *Rev Virtual Quim.* 2010;2(2):118-29.
67. Biot C, Chavain N, Dubar F, Pradines B, Trivelli X, Brocard J, et al. "Structure-activity relationships of 4-N-substituted ferroquine analogues: Time to re-evaluate the mechanism of action of ferroquine". *J Organomet Chem.* 2009;694(6):845-54.
68. Glória PM, Gut J, Gonçalves LM, Rosenthal P, Moreira R, Santos M. "Aza-vinyl sulfones: synthesis and evaluation as antimalarials". *Bioorg Med Chem Lett.* 2011.
69. Chibale K, Moss JR, Blackie M, van Schalkwyk D, Smith PJ. "New amine and urea analogs of ferrochloroquine: synthesis, antimalarial activity in vitro and electrochemical studies". *Tetrahedron Lett.* 2000;41(32):6231-5.
70. Sun L, Tran N, Tang F, App H, Hirth P, McMahon G, et al. "Synthesis and Biological Evaluations of 3-Substituted Indolin-2-ones: A Novel Class of Tyrosine Kinase Inhibitors That Exhibit Selectivity toward Particular Receptor Tyrosine Kinases". *J Med Chem.* 1998;41(14):2588-603.
71. Perrin DD, W.L.F. A. "Purification of Laboratory Chemicals". Ed. r, editor. Oxford: Pergamon Press; 1998.
72. Dineen TA, Zajac MA, Myers AG. "Efficient Transamidation of Primary Carboxamides by in Situ Activation with N,N-Dialkylformamide Dimethyl Acetals". *J Am Chem Soc.* 2006;128(50):16406-9.

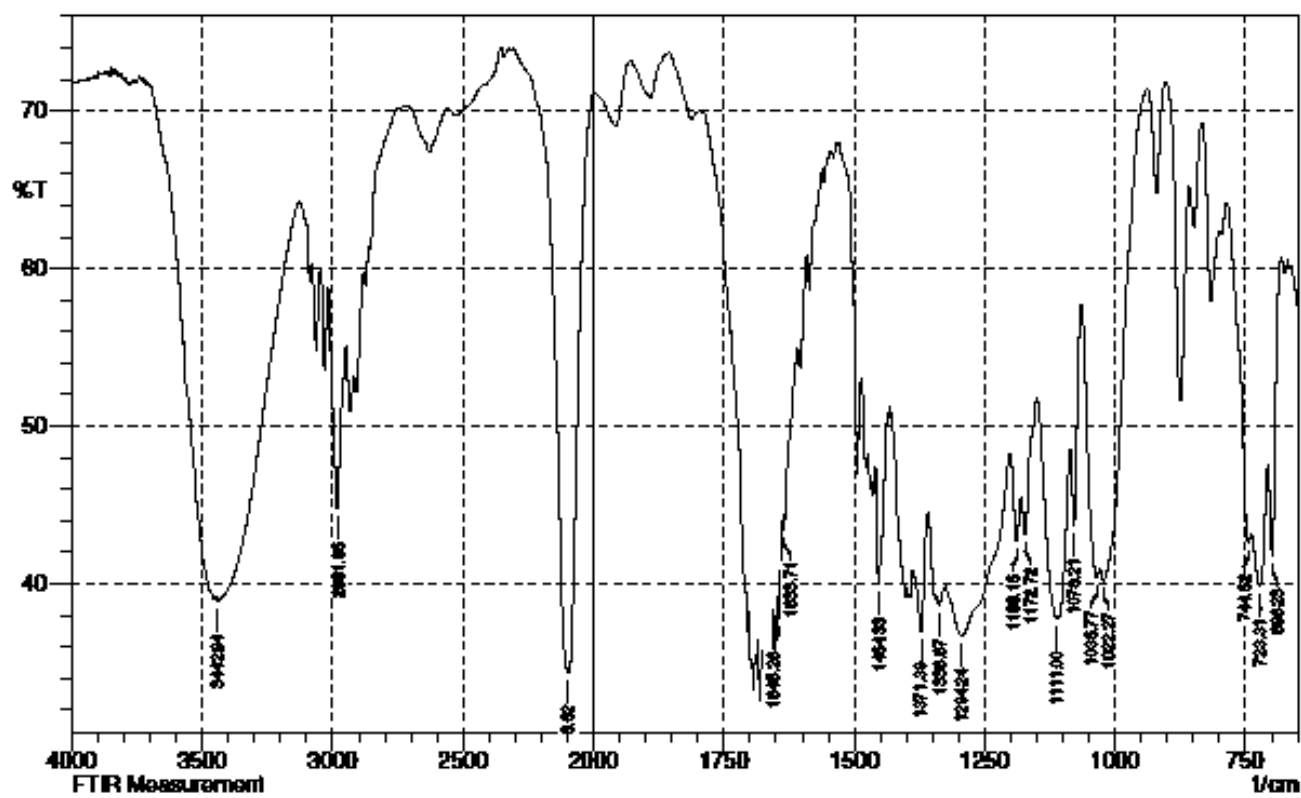
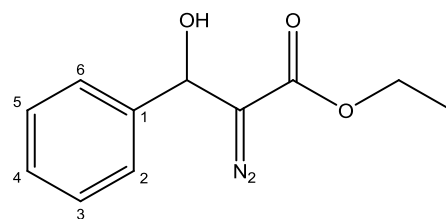
73. Cody WL, He JX, Reily MD, Haleen SJ, Walker DM, Reyner EL, et al. "Design of a potent combined pseudopeptide endothelin-A/endothelin-B receptor antagonist, Ac-DBhg16-Leu-Asp-Ile-[NMe]Ile-Trp21 (PD 156252): examination of its pharmacokinetic and spectral properties". J Med Chem. 1997;40(14):2228-40.

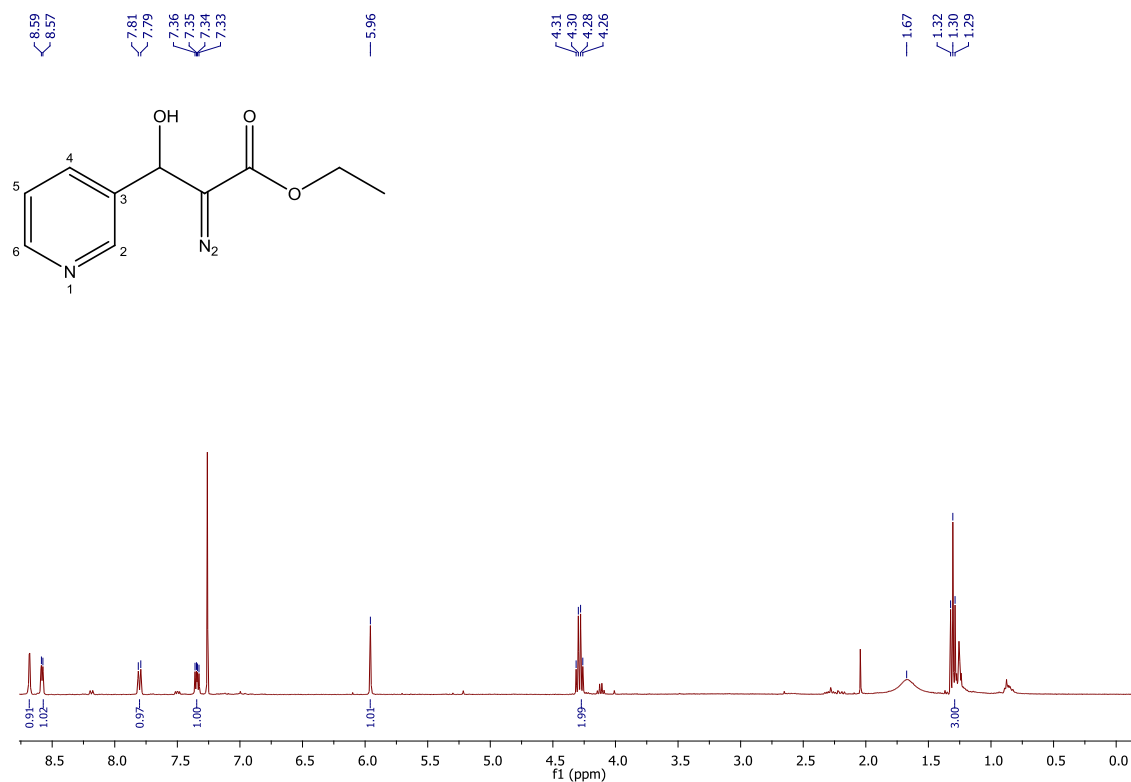
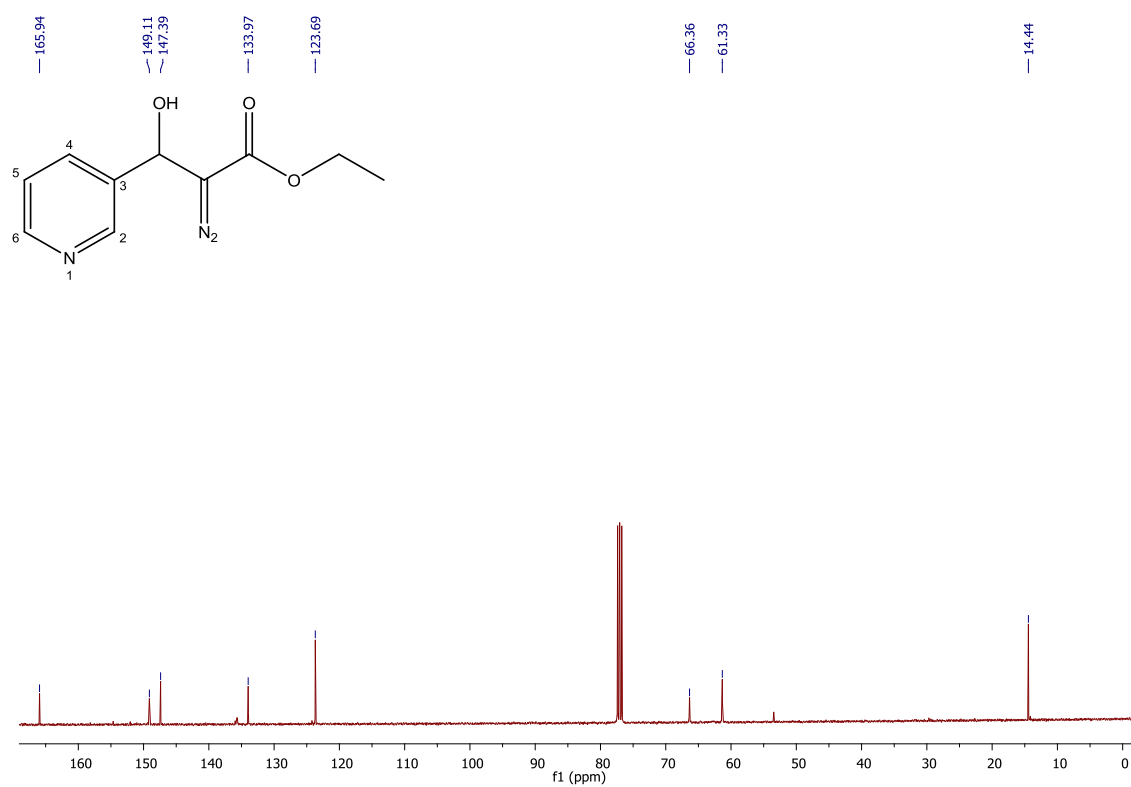
V. Anexos

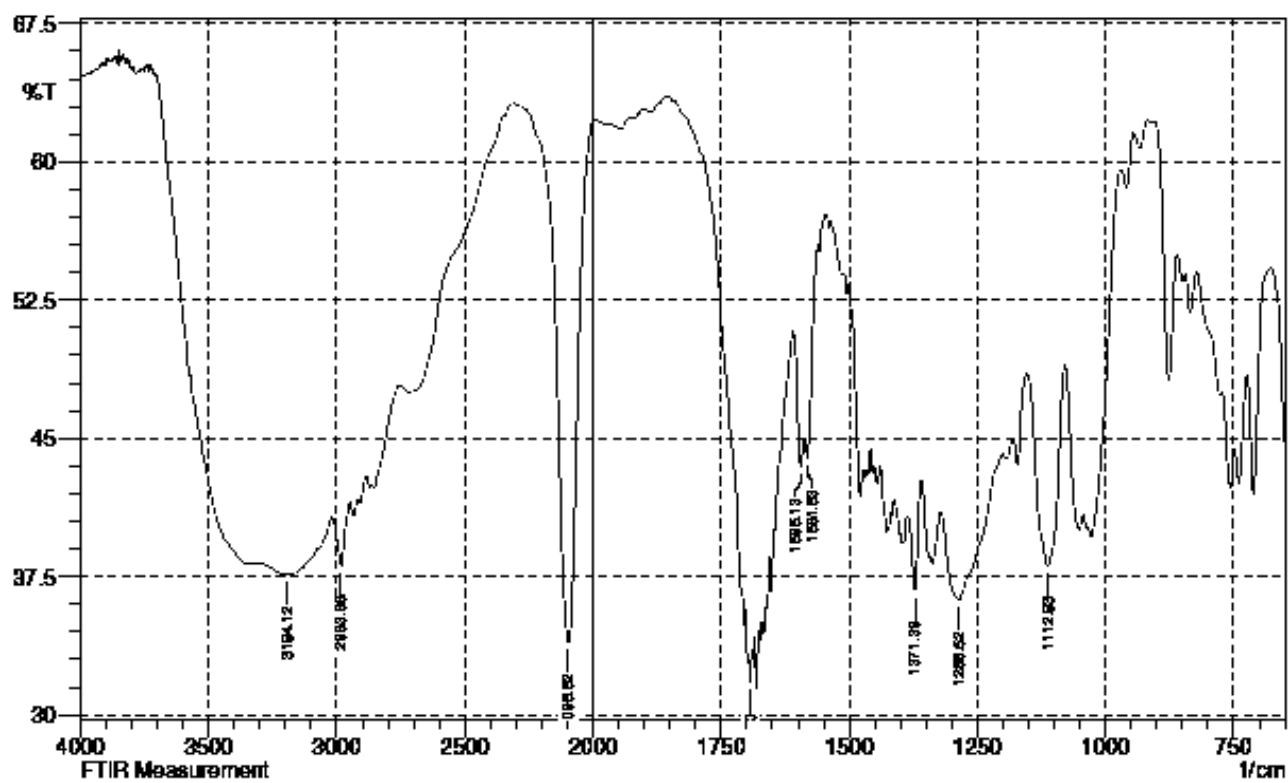
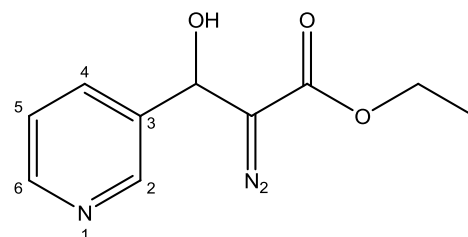
Anexo A (45a)Espectro ^1H -RMN do composto **45a****Anexo B (45b)**Espectro ^1H -RMN do composto **45b**

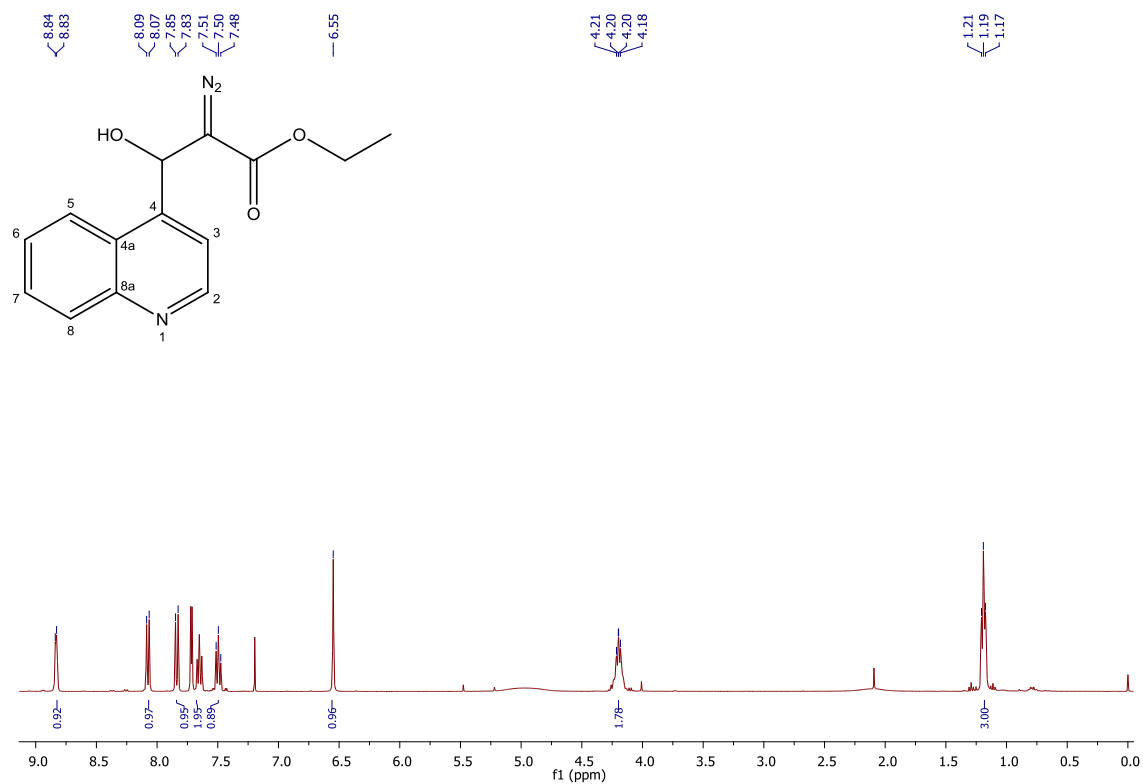
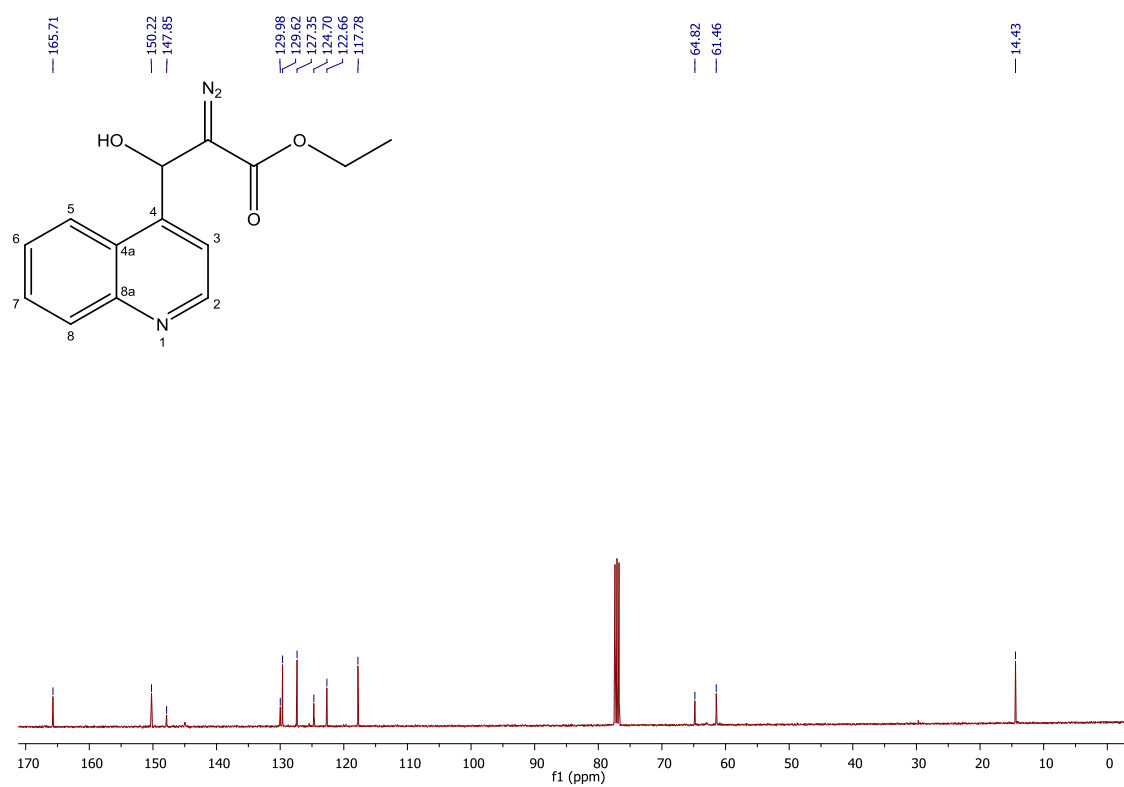
Anexo C (46a)Espectro ^1H -RMN do composto **46a****Anexo D (46b)**Espectro ^1H -RMN do composto **46b**

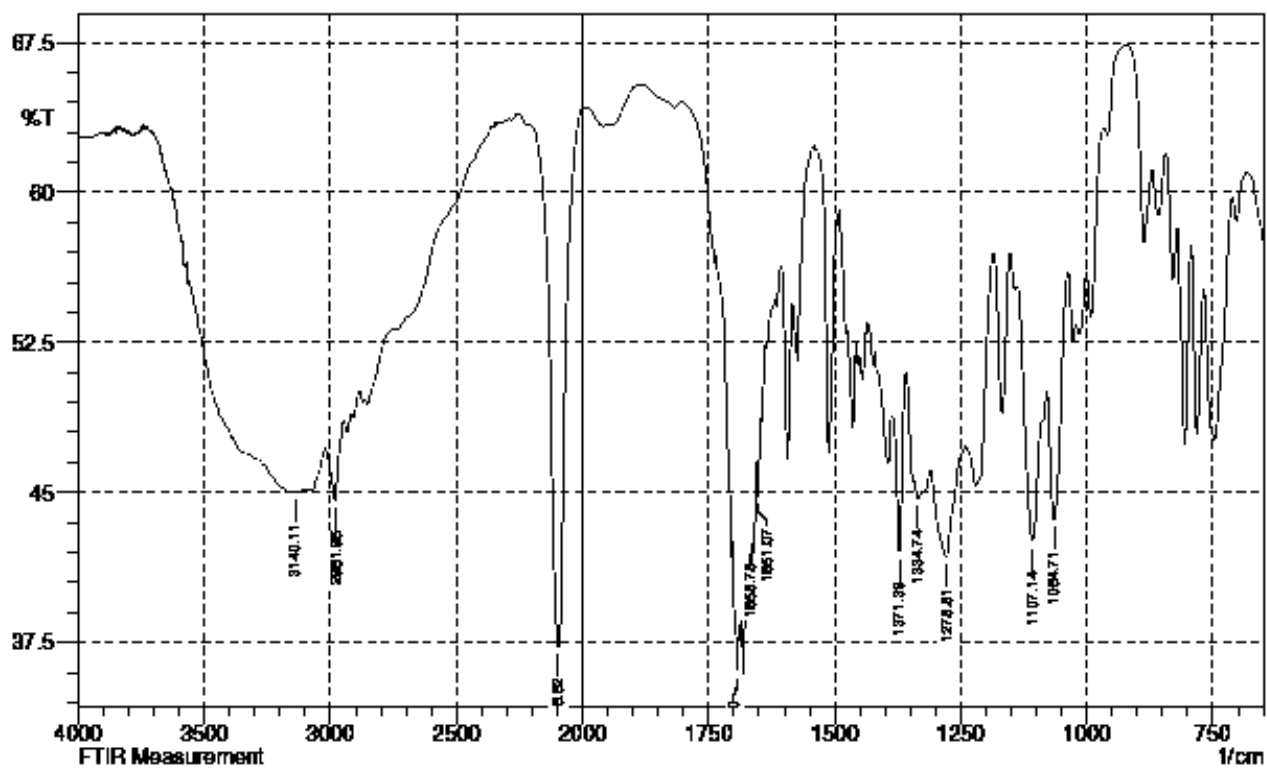
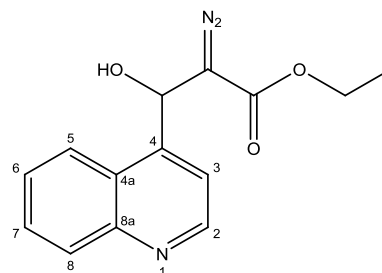
Anexo E (51a)**Espectro ^1H -RMN do composto 51a****Espectro ^{13}C -RMN do composto 51a**

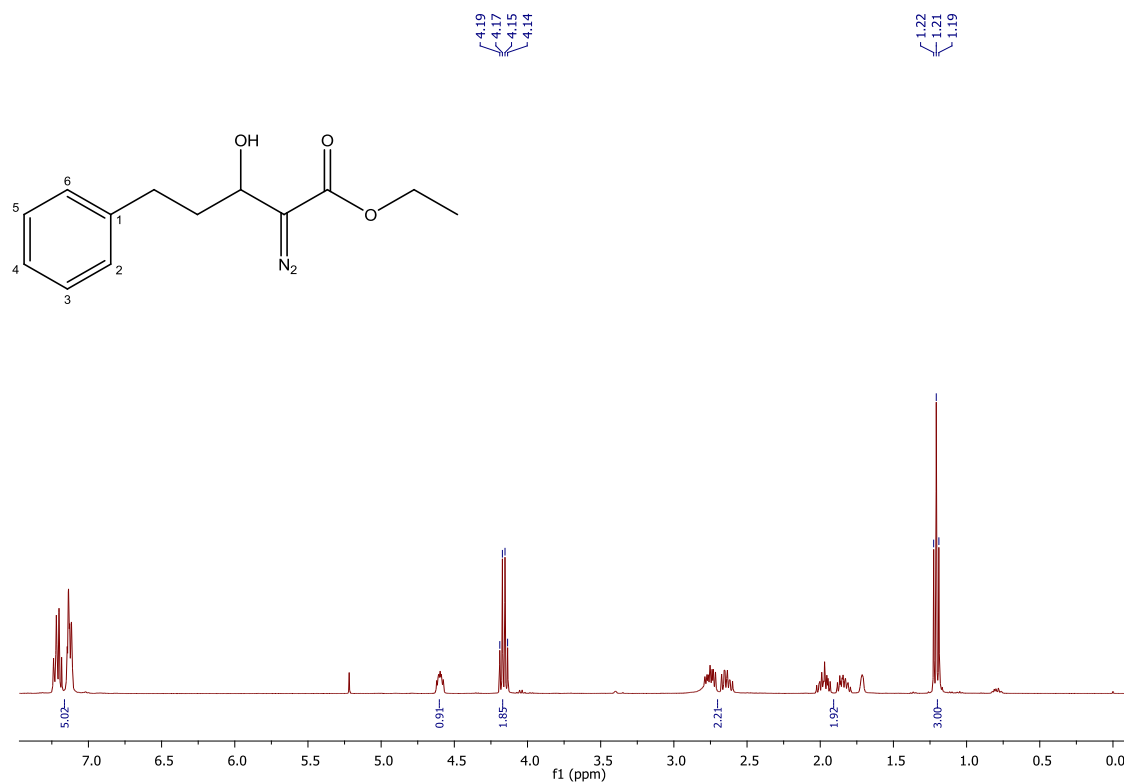
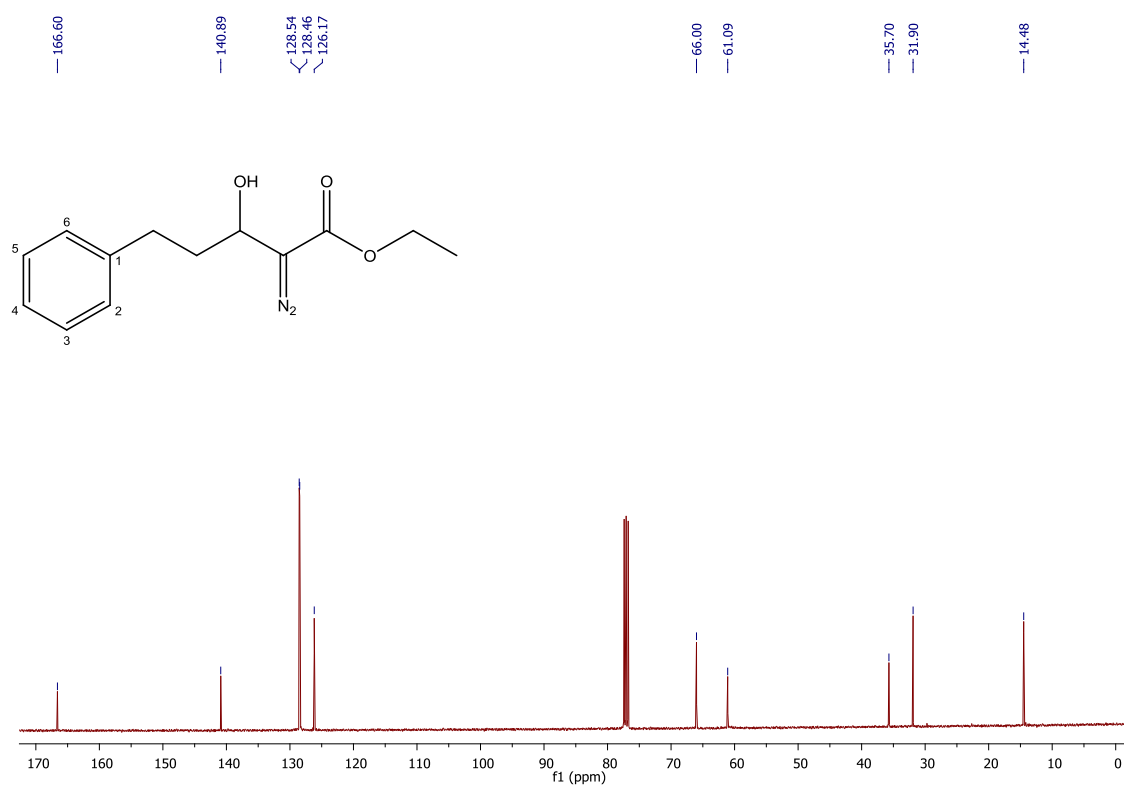
Espectro de IV do composto **51a**

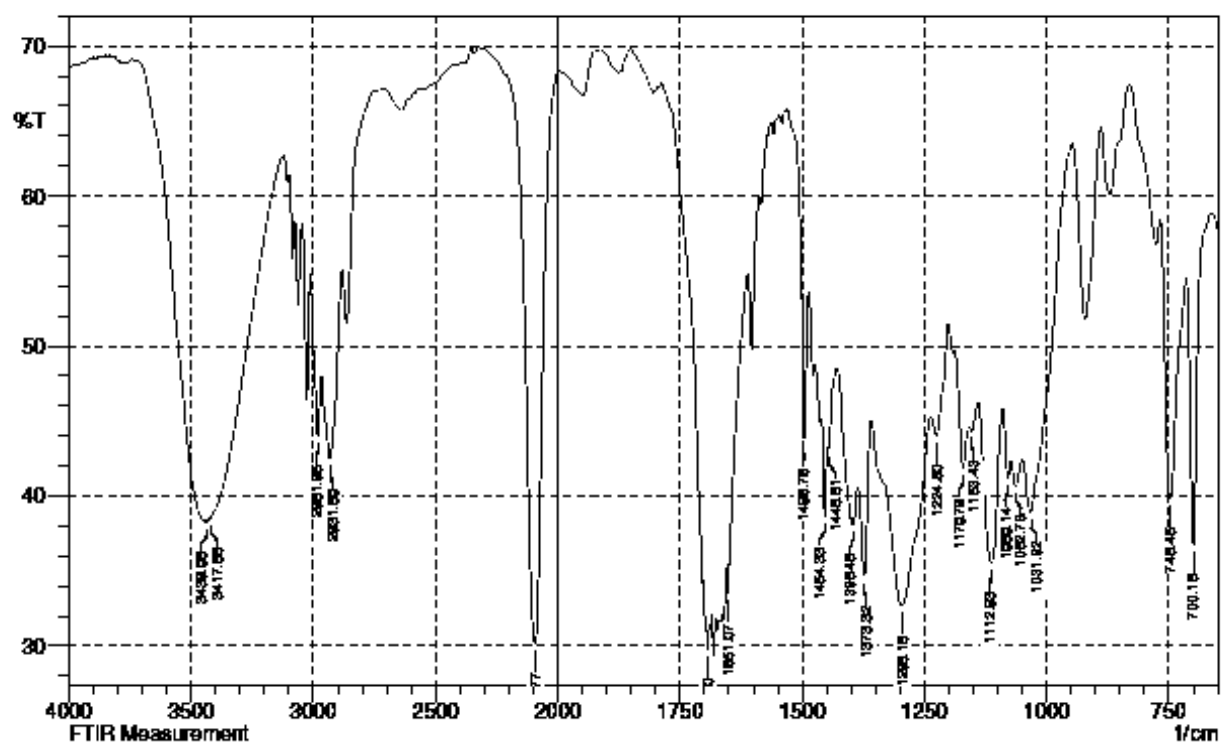
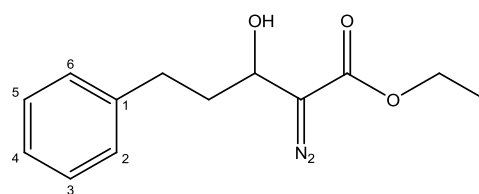
Anexo F (51b)**Espectro ^1H -RMN do composto 51b****Espectro ^{13}C -RMN do composto 51b**

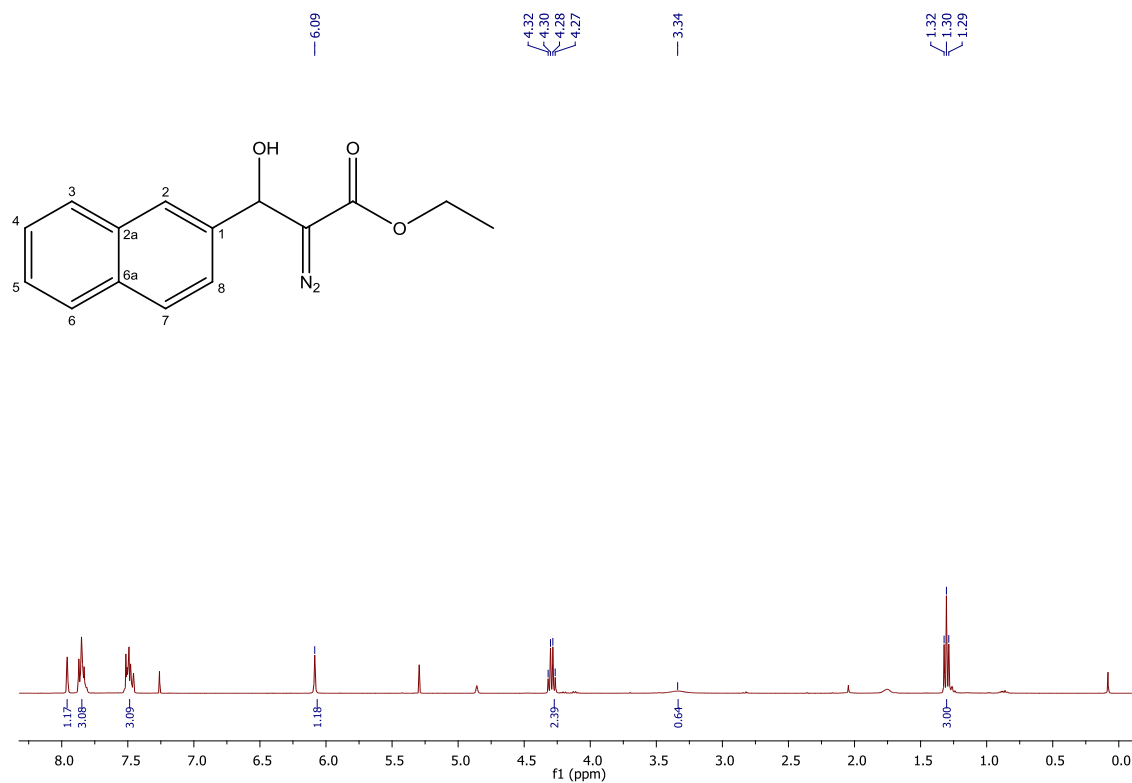
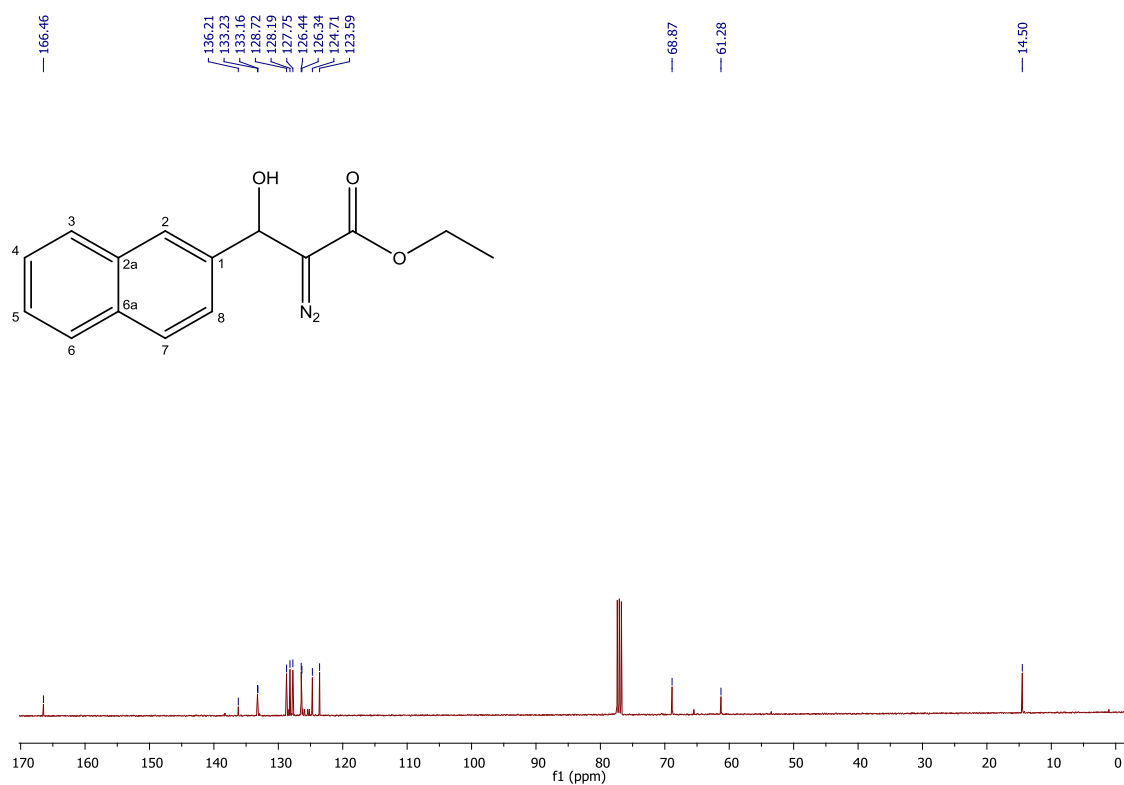
Espectro de IV do composto **51b**

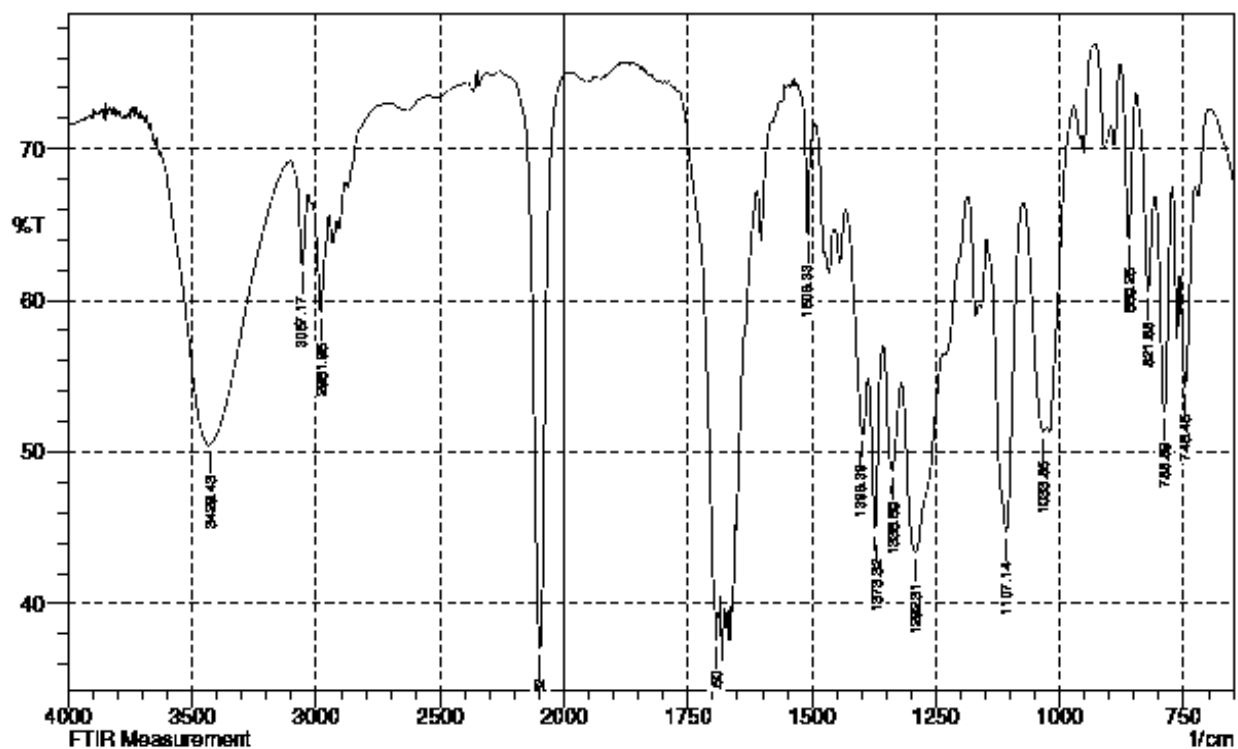
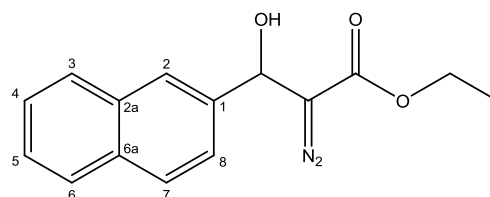
Anexo G (51c)**Espectro ^1H -RMN do composto 51c****Espectro ^{13}C -RMN do composto 51c**

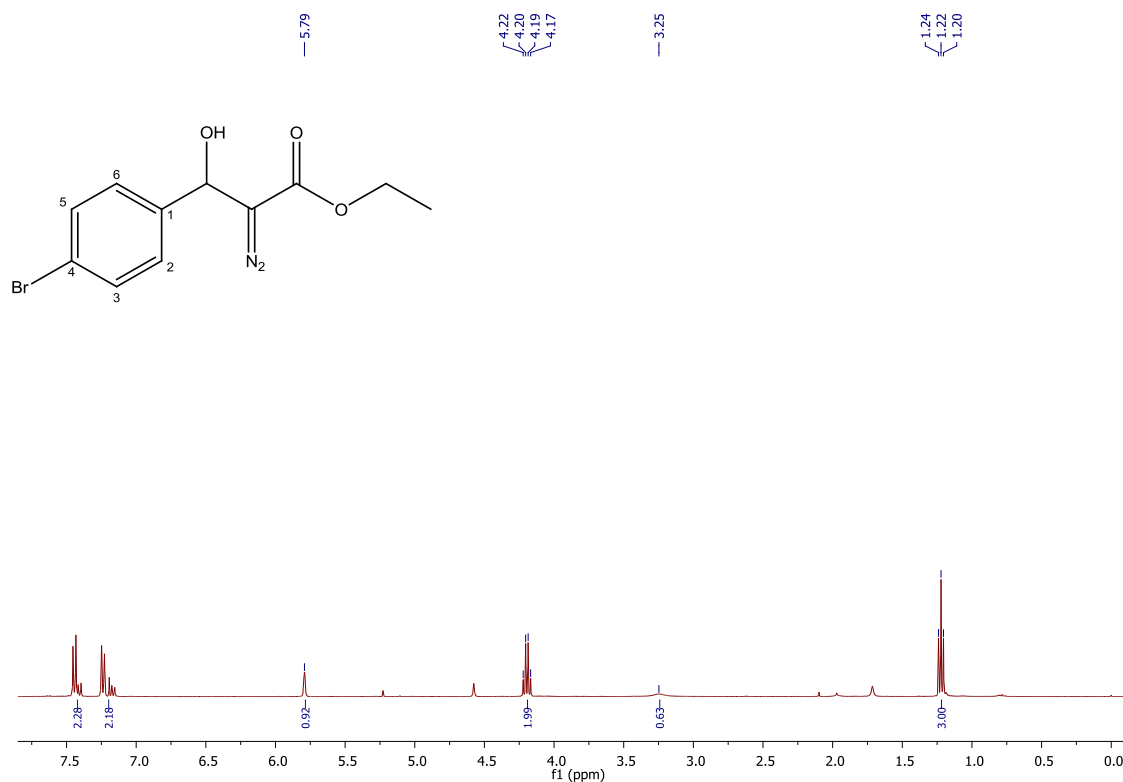
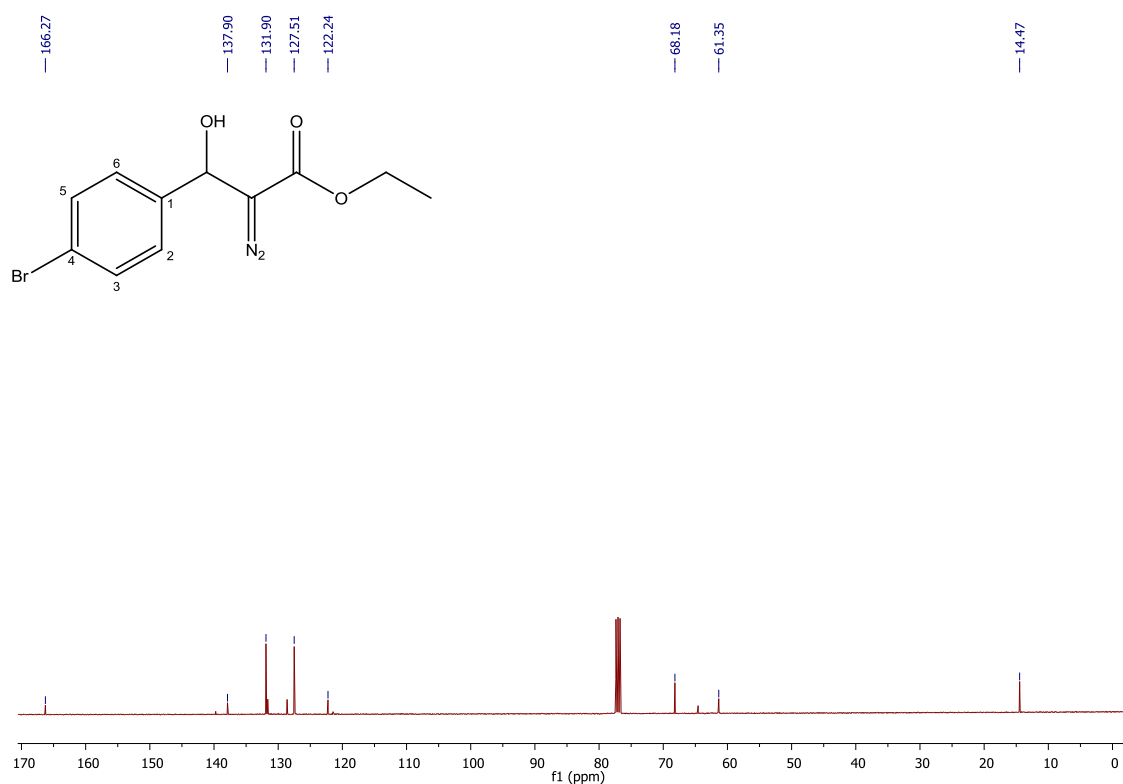


Anexo H (51d)Espectro ^1H -RMN do composto **51d**Espectro ^{13}C -RMN do composto **51d**

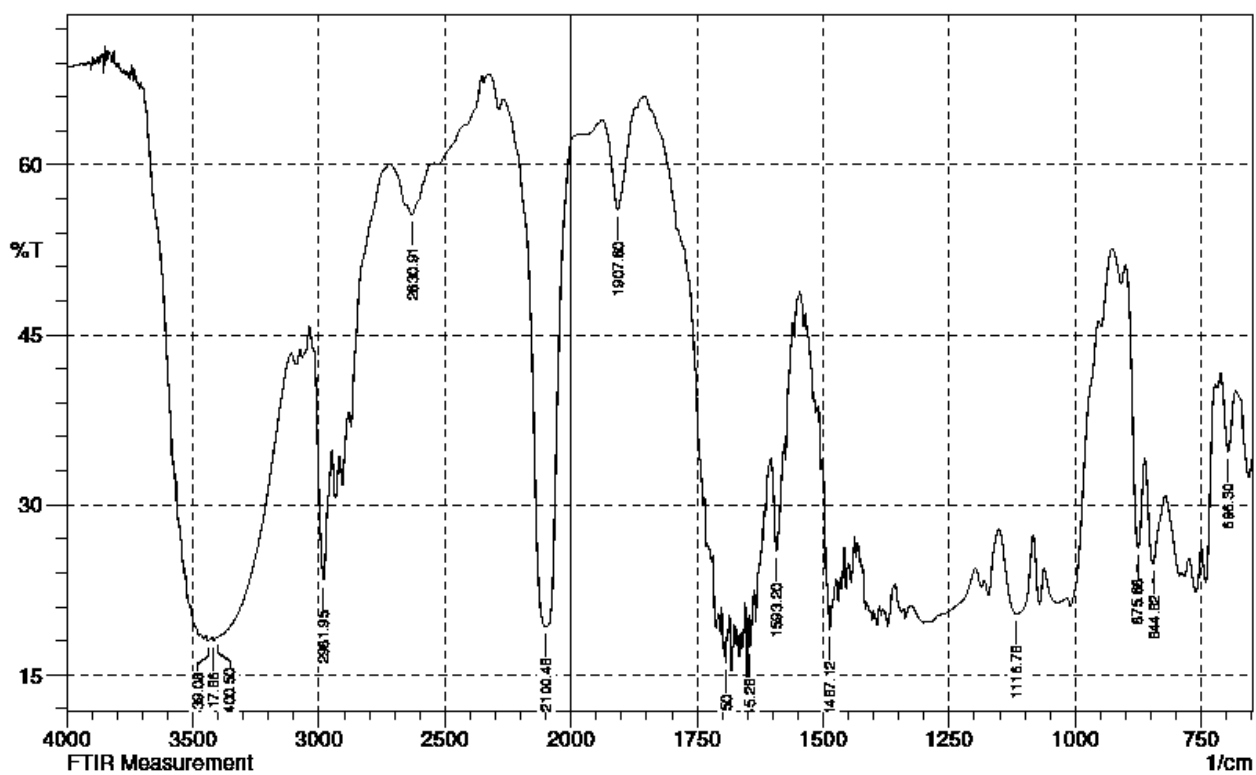
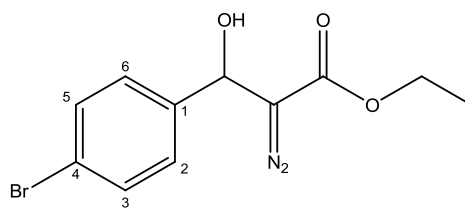
Espectro de IV do composto **51d**

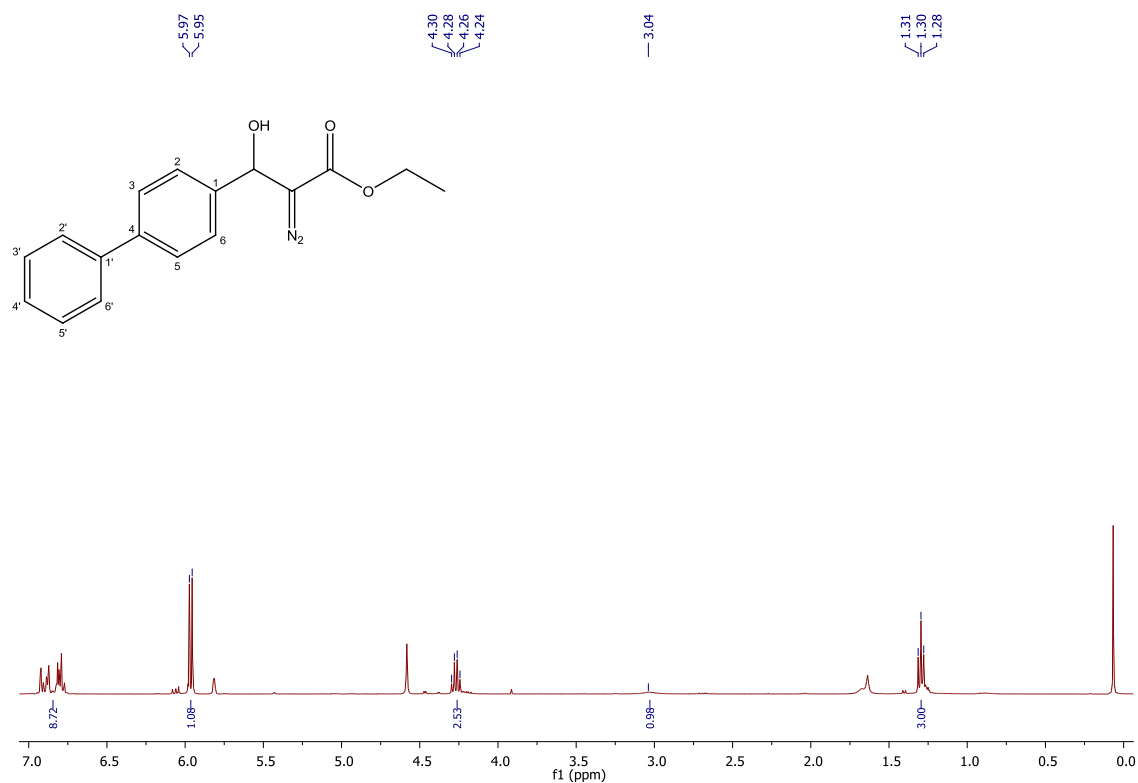
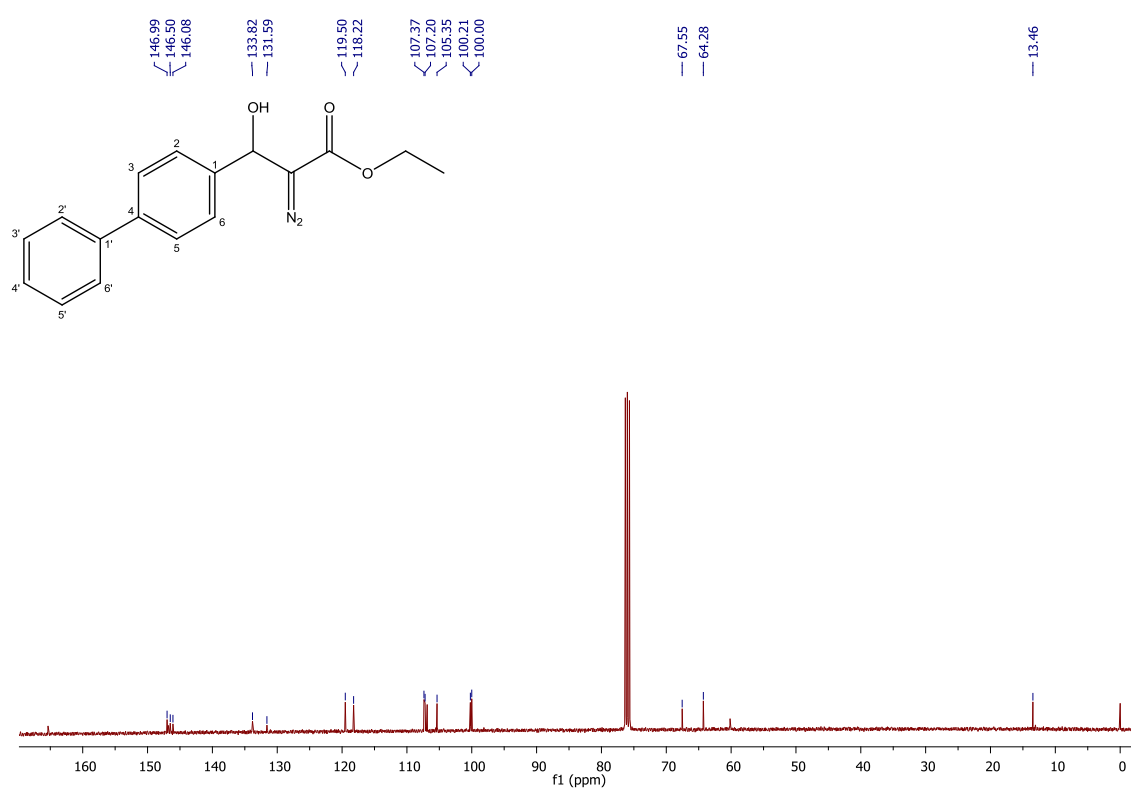
Anexo I (51e)**Espectro ^1H -RMN do composto 51e****Espectro ^{13}C -RMN do composto 51e**

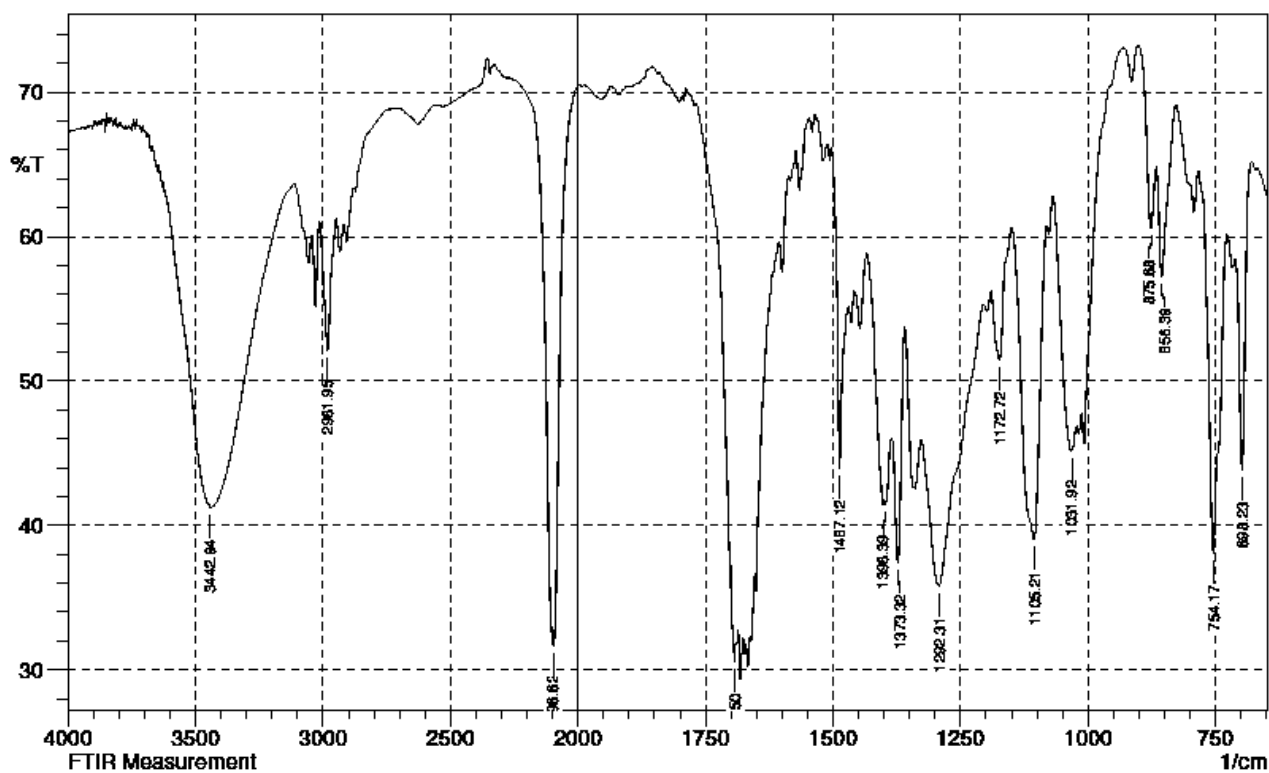
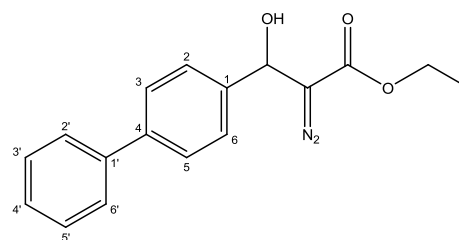
Espectro de IV do composto **51e**

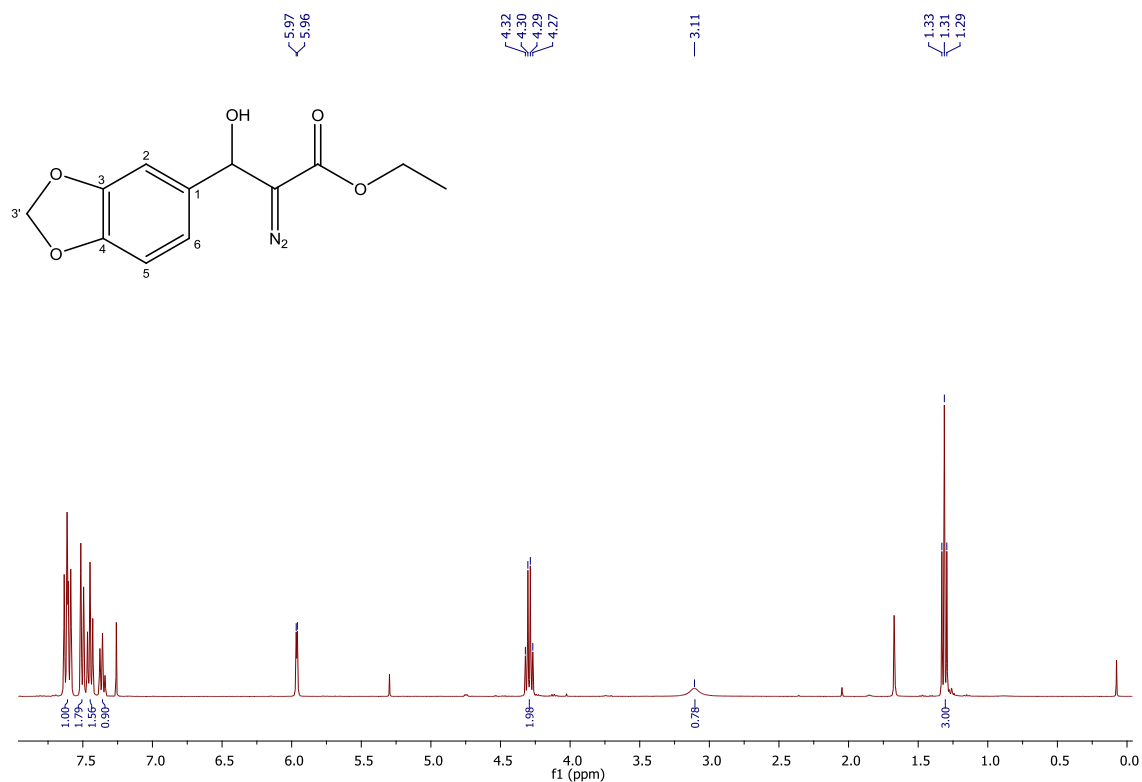
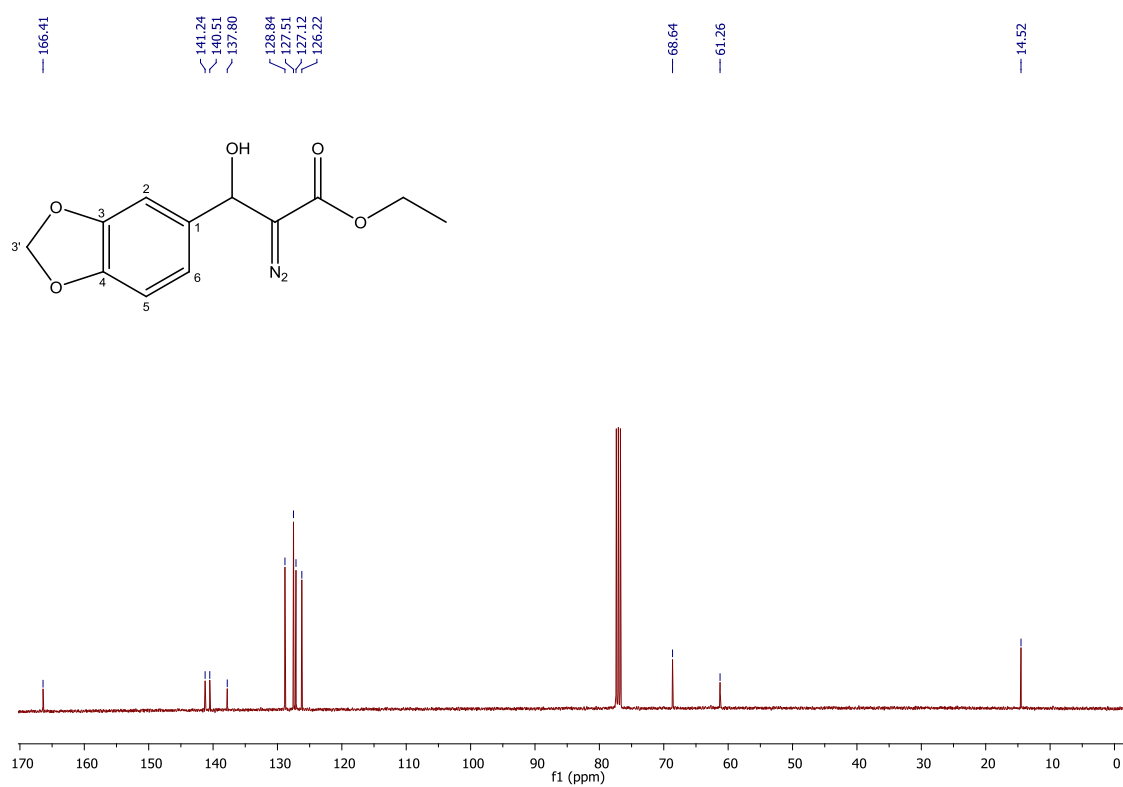
Anexo J (51f)**Espectro ^1H -RMN do composto 51f****Espectro ^{13}C -RMN do composto 51f**

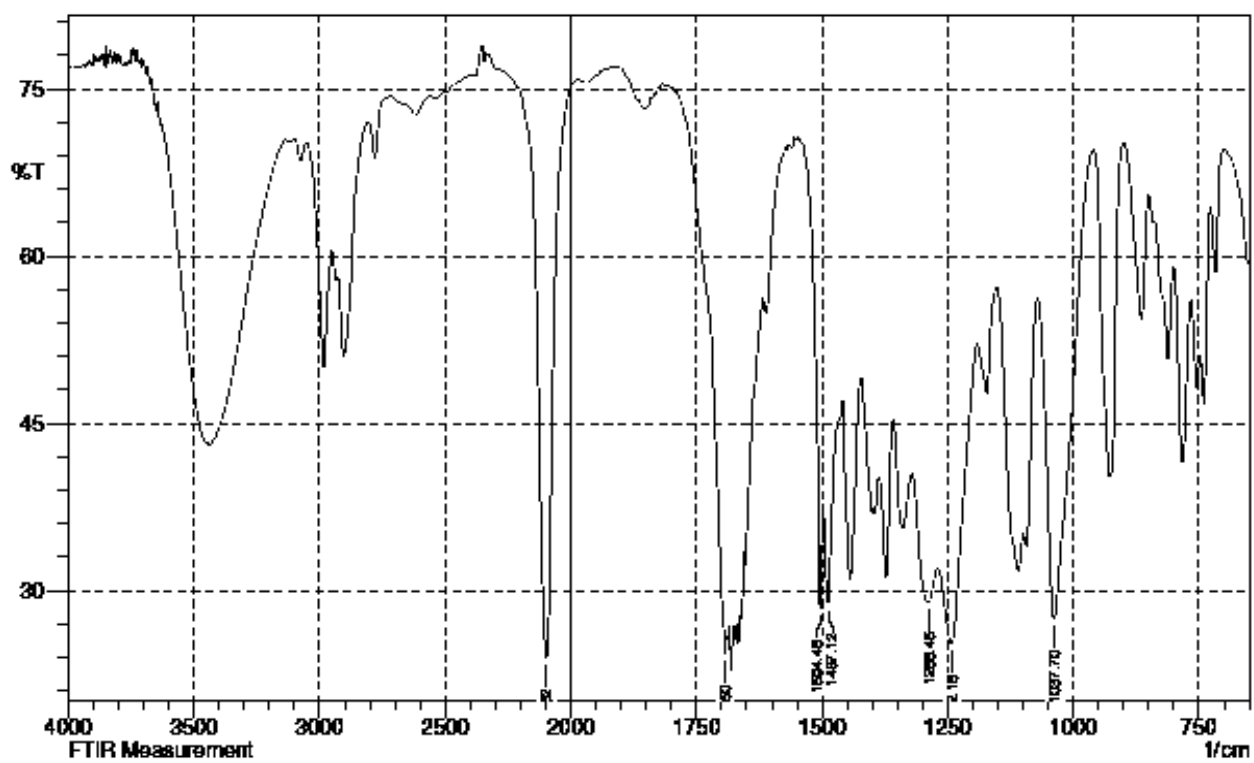
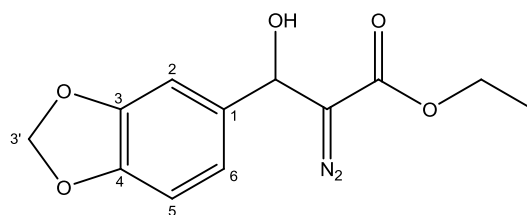
Espectro de IV do composto 51f

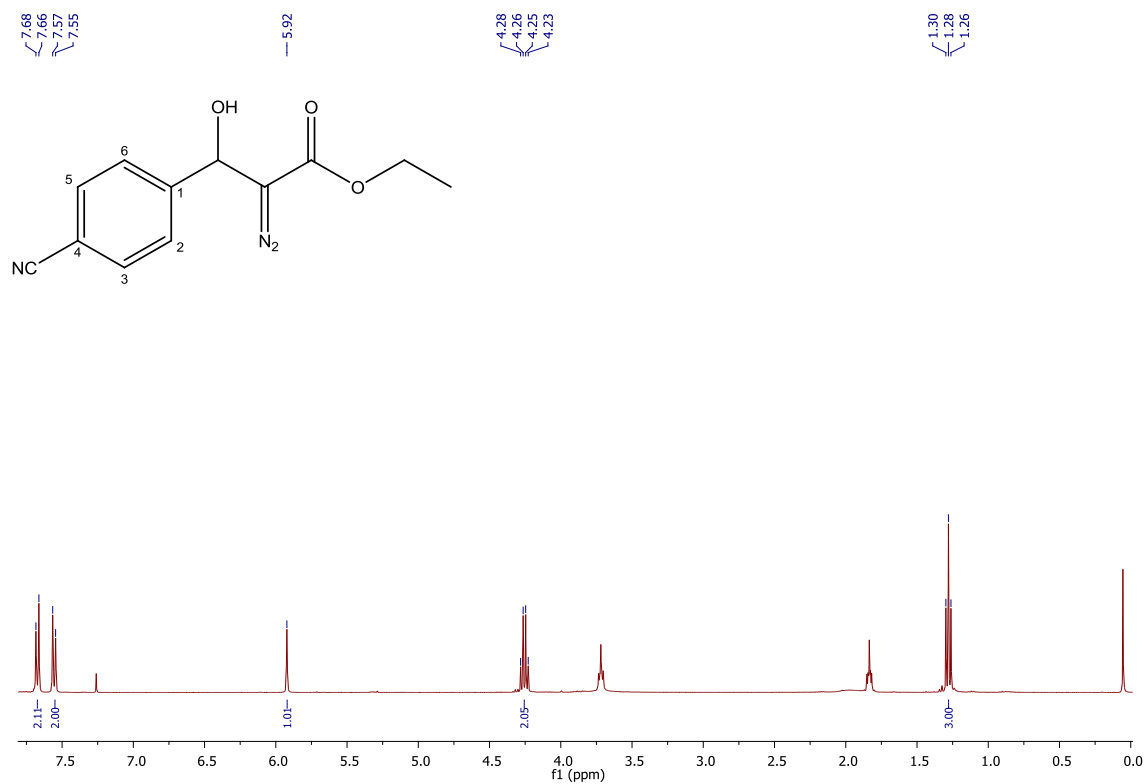
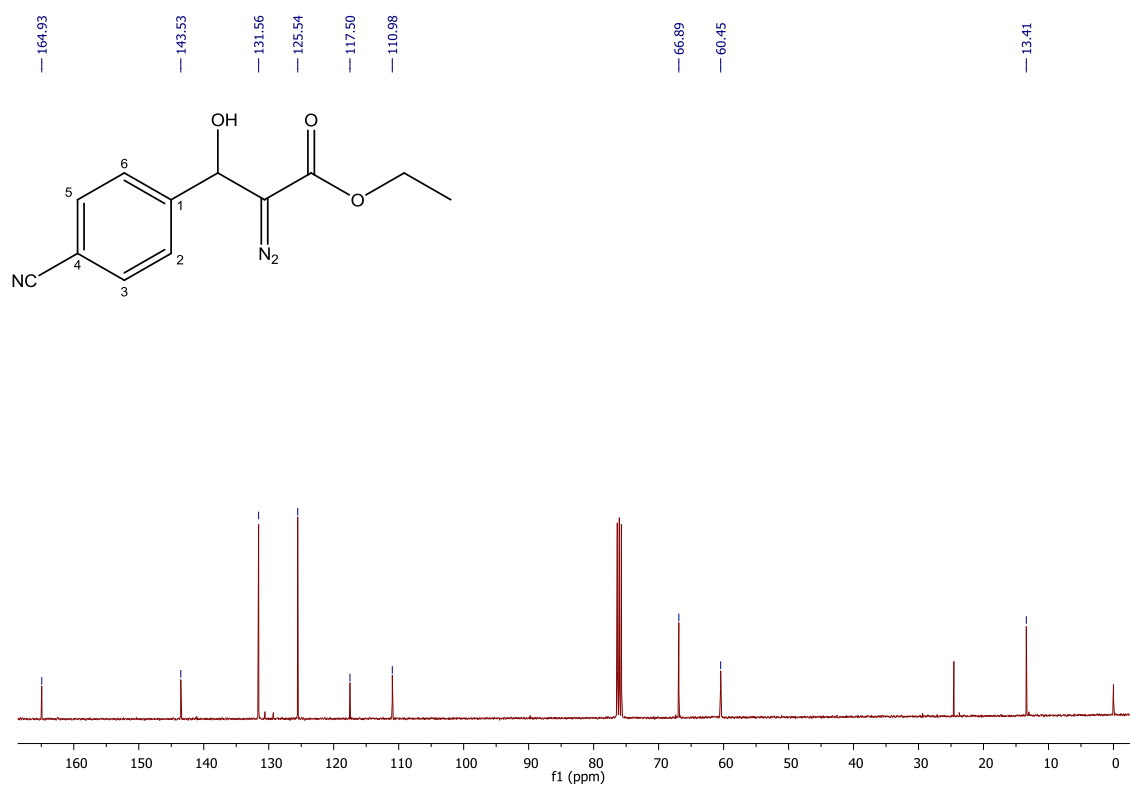


Anexo K (51g)**Espectro ^1H -RMN do composto 51g****Espectro ^{13}C -RMN do composto 51g**

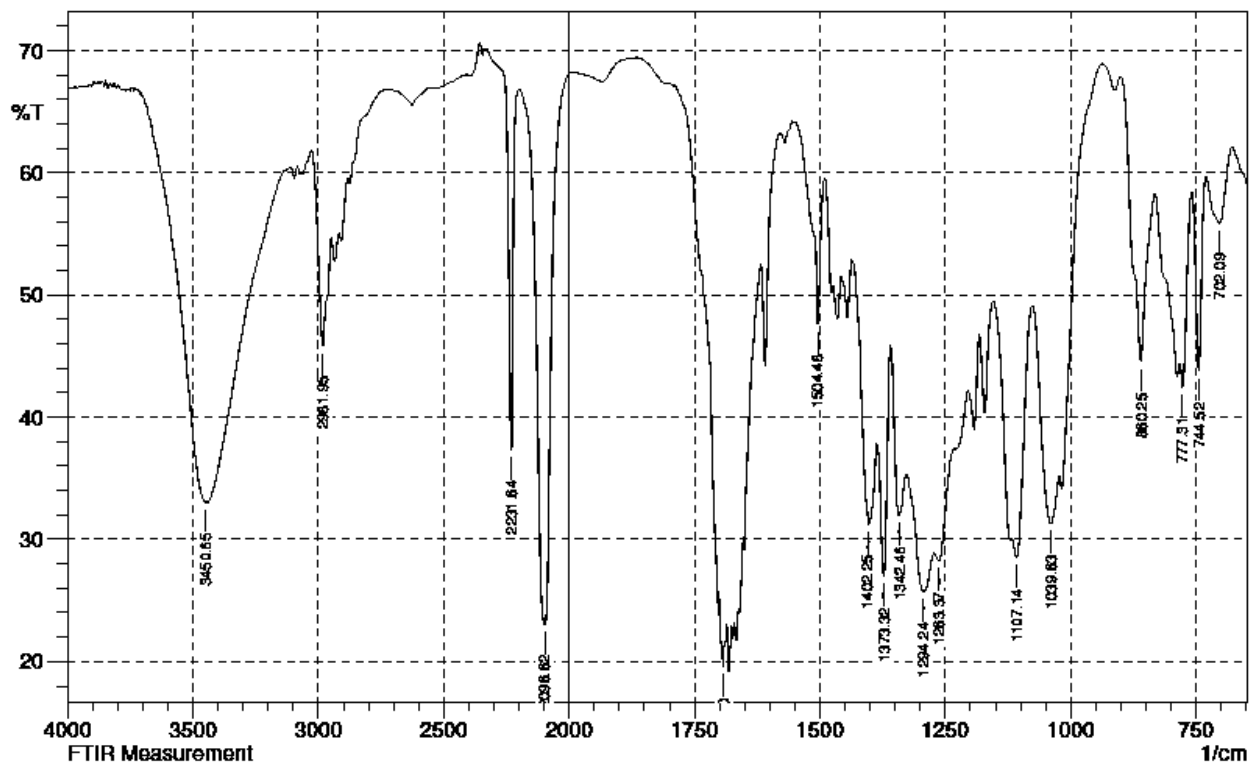
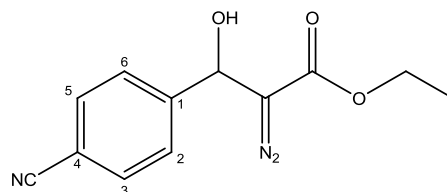
Espectro de IV do composto **51g**

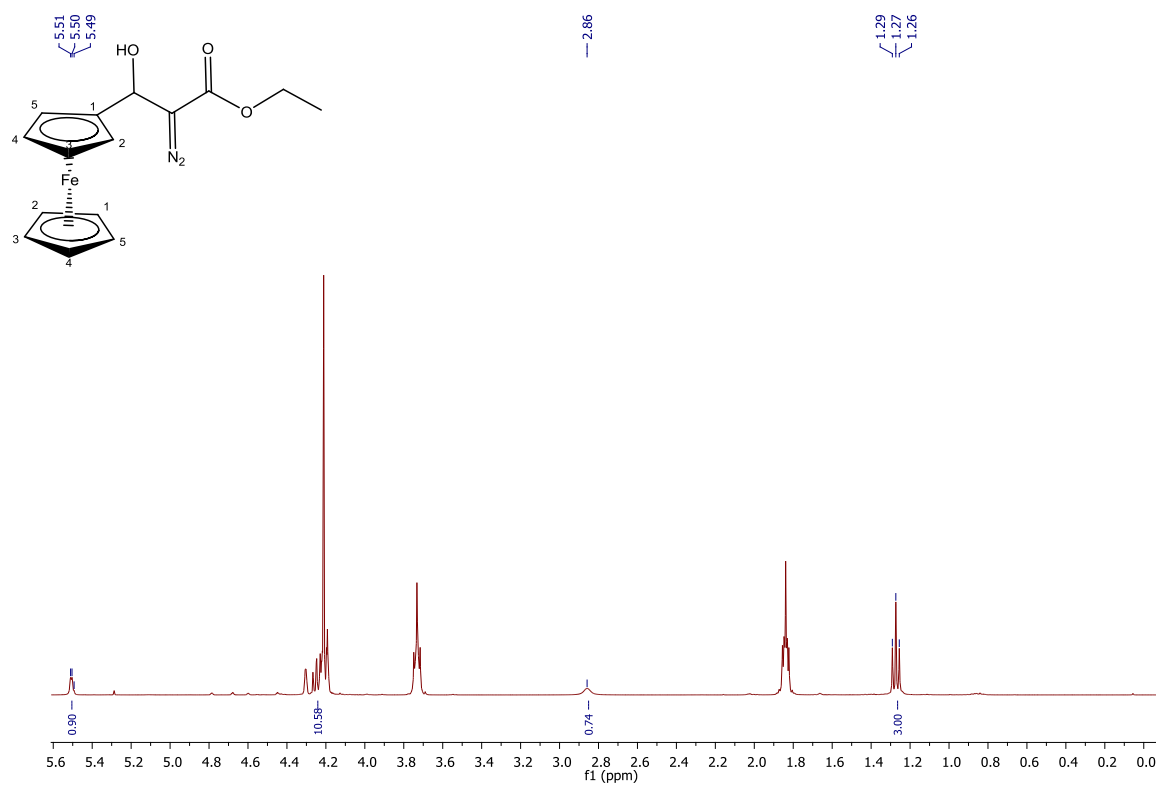
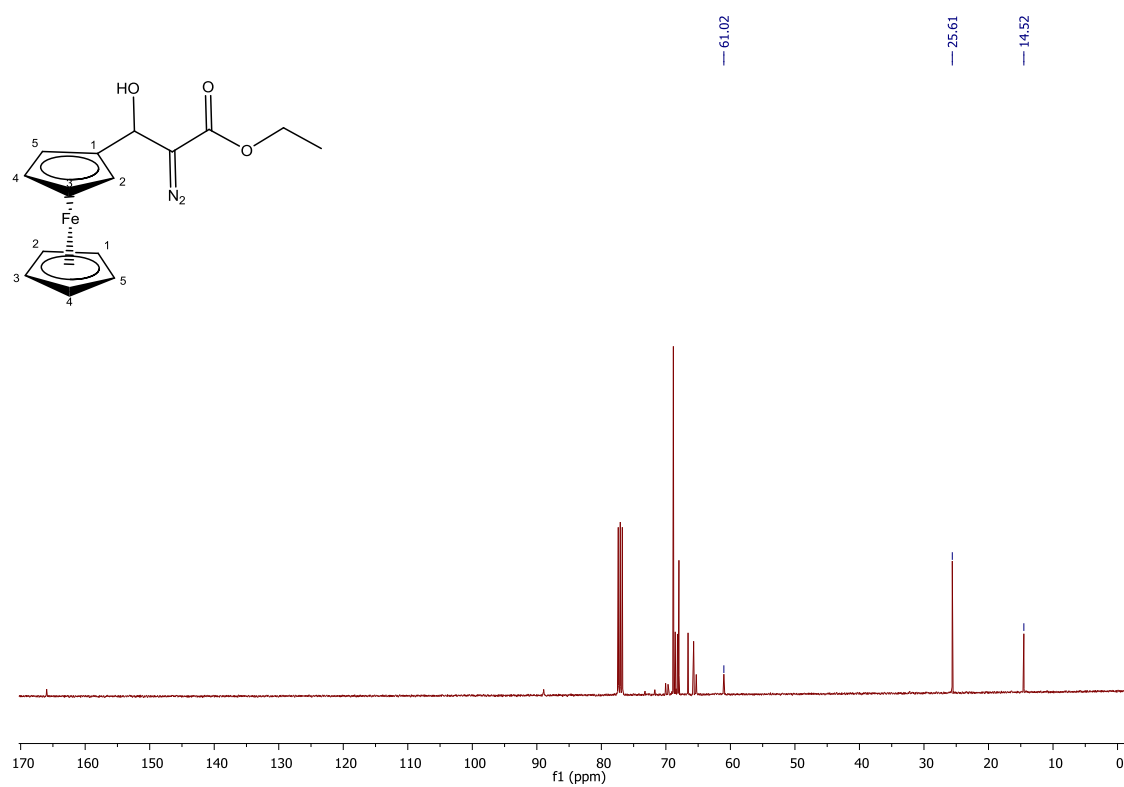
Anexo L (51h)**Espectro ^1H -RMN do composto 51h****Espectro ^{13}C -RMN do composto 51h**

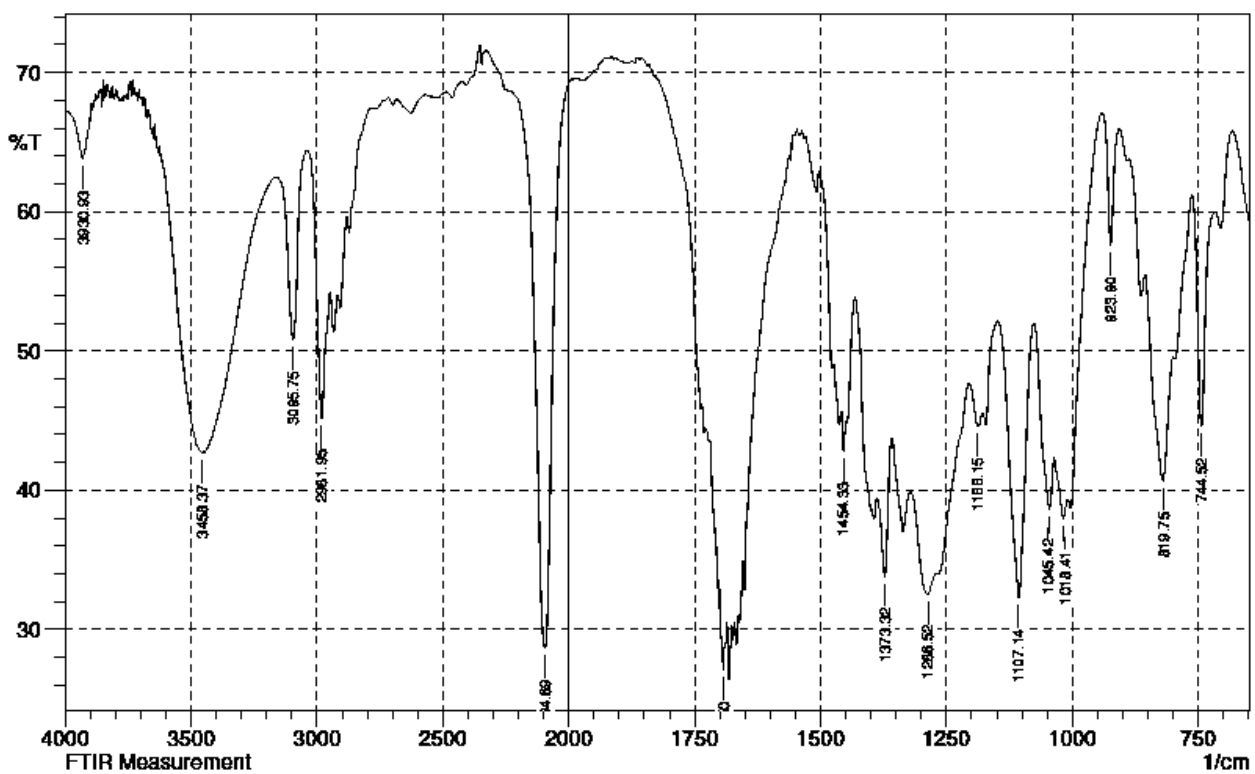
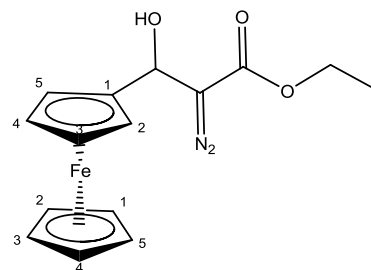
Espectro de IV do composto **51h**

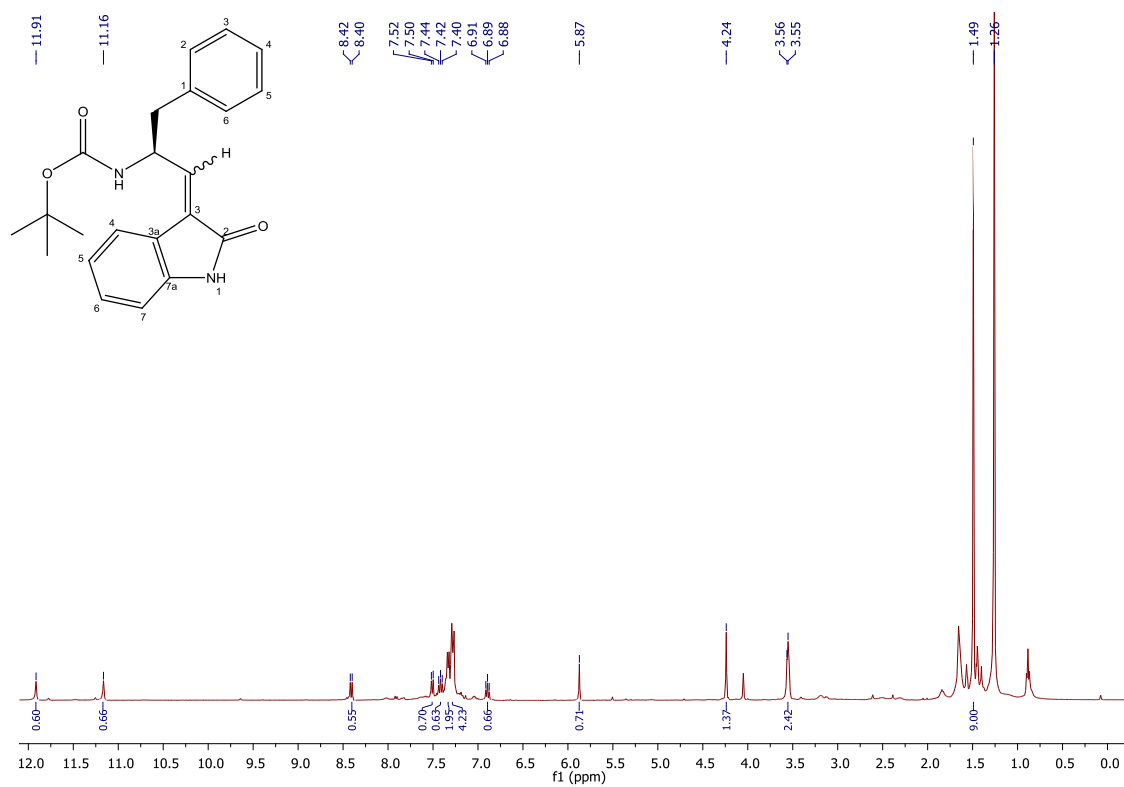
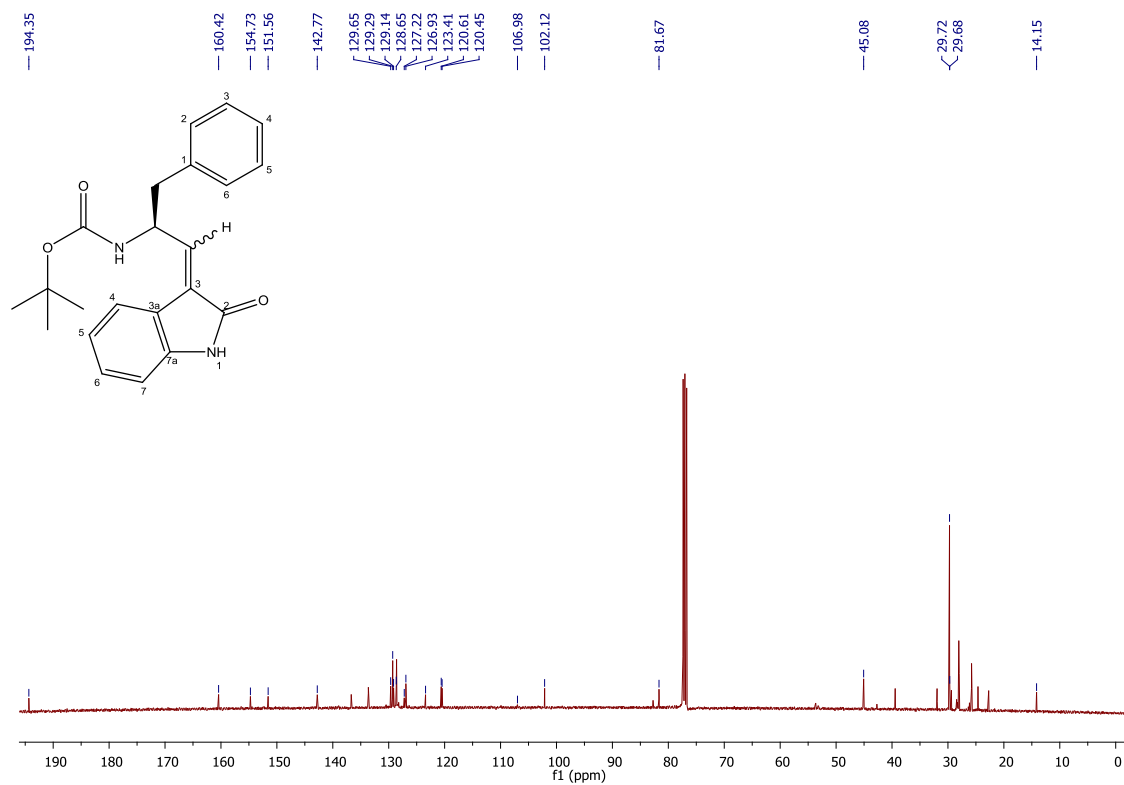
Anexo M (51i)**Espectro ^1H -RMN do composto 51i****Espectro ^{13}C -RMN do composto 51i**

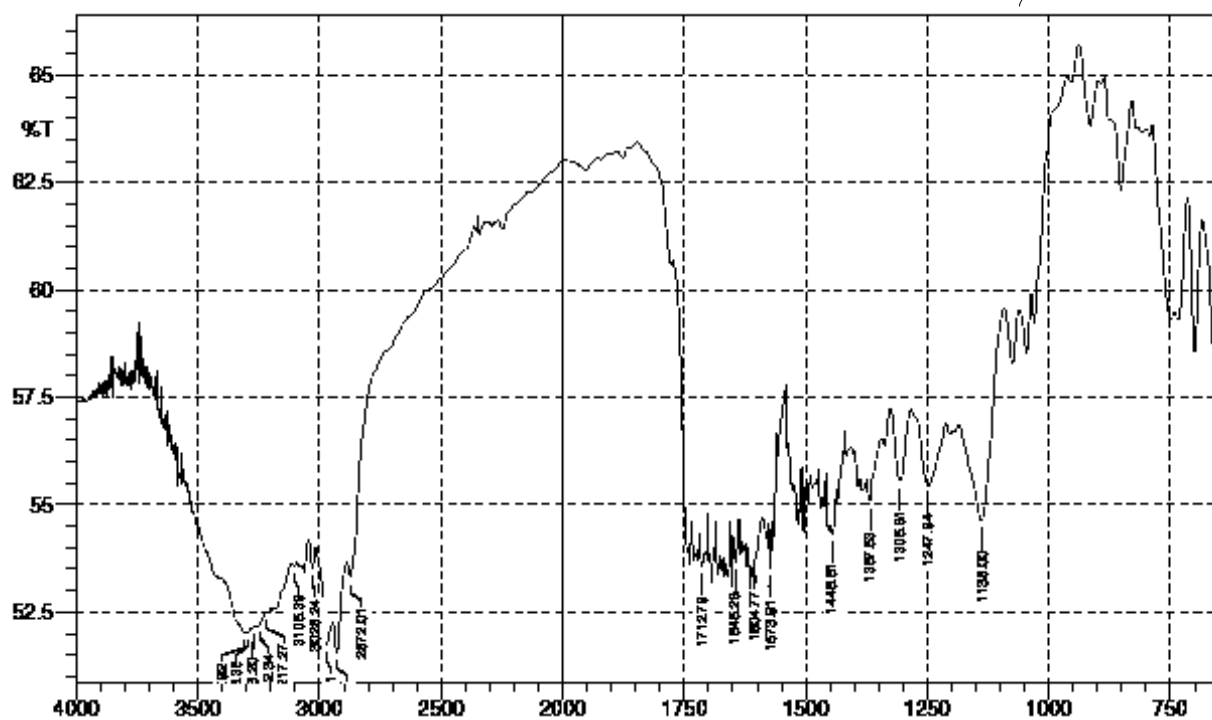
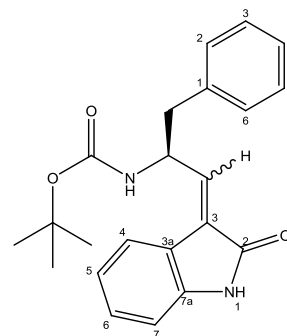
Espectro de IV do composto 51i

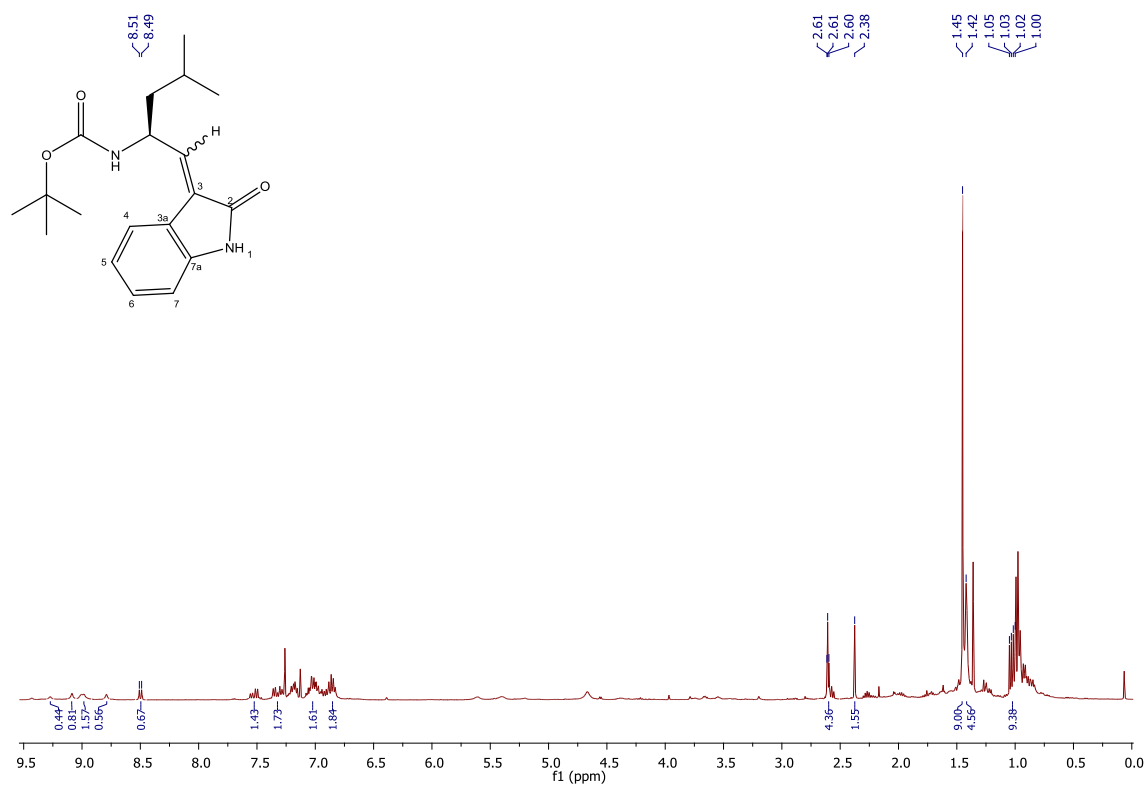
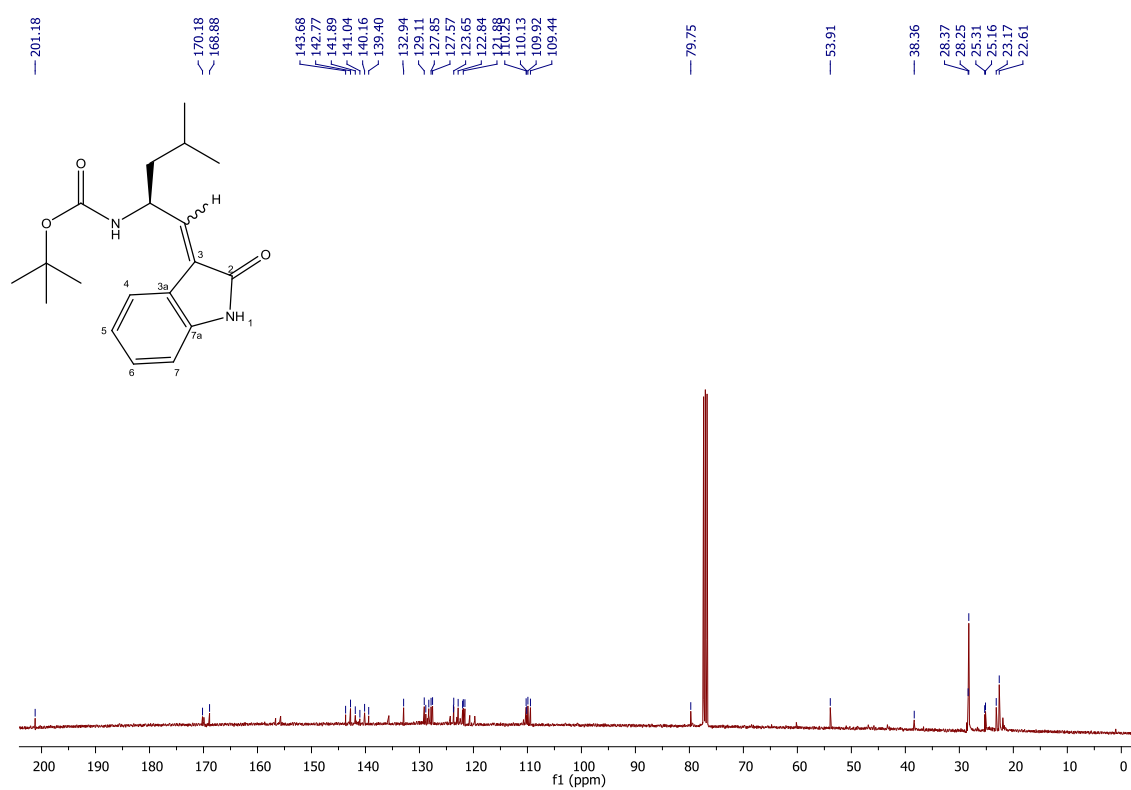


Anexo N (51j)**Espectro ^1H -RMN do composto 51j****Espectro ^{13}C -RMN do composto 51j**

Espectro de IV do composto **51j**

Anexo O (55a)**Espectro ^1H -RMN do composto 55a****Espectro ^{13}C -RMN do composto 55a**

Espectro de IV do composto **55a**

Anexo P (55b)**Espectro ^1H -RMN do composto 55b****Espectro ^{13}C -RMN do composto 55b**

Espectro de IV do composto **55b**